

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCUS VINÍCIUS BRANDALIZE

EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE *Chlorella pyrenoidosa* ASSISTIDA EM ULTRASSOM

CURITIBA

2014

MARCUS VINÍCIUS BRANDALIZE

EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE *Chlorella pyrenoidosa* ASSISTIDA EM ULTRASSOM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos.

CURITIBA

2014

B817e

Brandalize, Marcus Vinícius

Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom/ Marcus Vinícius Brandalize. – Curitiba, 2014.
89 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, 2014.

Orientador: Marcos Lúcio Corazza – Co-orientador: Luiz Pereira Ramos.
Bibliografia: p. 86-89.

1. Extração (Química). 2. Ultrassom. 3. Microalgas. 4. Esterificação (Química). 5. Biodiesel. I. Universidade Federal do Paraná. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Ramos, Luiz Pereira. IV. Título.

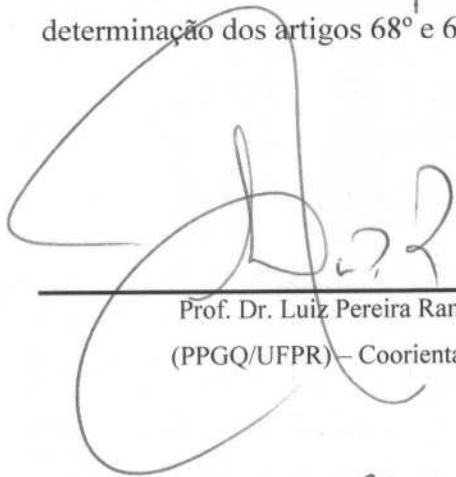
CDD: 665.37



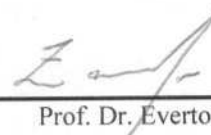
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos doze dias do mês de dezembro de 2014, na Sala EQ16 do Prédio de Engenharia Química no Centro Politécnico – UFPR foi instalada, pelo Prof. Dr. Marcelo Kaminski Lenzi, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a Banca Examinadora para a sexagésima oitava defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos. Estiveram presentes no ato, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, foi constituída pelos professores doutores: Luiz Pereira Ramos (PPGQ/UFPR), Everton Fernando Zanoelo (PPGEQ/UFPR) e Claudiney Soares Cordeiro (PPGQ/UFPR). Às 14h00min, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Marcus Vinicius Brandalize** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada **“Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom”**. 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 68º e 69º da Resolução 65/09 – CEPE/UFPR de 30.10.2009).

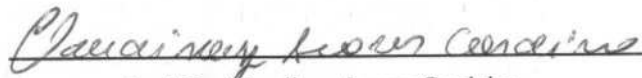
Curitiba, 12 de dezembro 2014.



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
(PPGQ/UFPR) – Coorientador



Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo
(PPGEQ/UFPR) – Membro Titular Interno



Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
(PPGQ/UFPR) – Membro Titular Externo

À minha mãe Eli Regina Jacomel
Ao meu irmão Pedro Henrique
À minha namorada Cristiane
À toda minha família

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por todas as oportunidades a mim concedidas mesmo não sendo merecedor, e por todas as pessoa que pôs a minha volta para que cada passo da minha jornada até aqui pudesse ser concretizada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza, pela amizade, incentivo e paciência. Por ter acreditado em mim mesmo antes do ingresso ao programa de mestrado, todos os conselhos e suporte durante este período.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, que me proporcionou a primeira oportunidade na vida acadêmica com um projeto de iniciação científica, e por todo o suporte dado para a concretização deste trabalho.

À minha mãe, Eli Regina Jacomel, por seu zelo e incentivo desde sempre para encarar os desafios da vida, e por ter me suportado em cada etapa, sem sua bravura e coragem certamente não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão Pedro Henrique Brandalize, que junto comigo encarou diversos desafios da vida, e mesmo com as intrigas entre irmãos, jamais nos deixamos abater.

A minha namorada Cristiane Cardim Hermoso, que me incentiva e inspira a cada dia, por seu companheirismo e por completar a minha vida de uma maneira inexplicável.

A minha família, em especial aos meus avós Carmem do Rocio de Lara e Jacira Jacomel, aos meus tios Luiz Alberto Jacomel e Luiz Carlos Jacomel e familiares por eles representados, que sempre me encorajaram e estiveram ao meu lado, desde os momentos mais difíceis até as comemorações de cada trunfo.

Ao professor Dr. Arion Zandoná Filho, pela amizade e sugestões de melhorias e suporte nas análises cromatográficas realizadas.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, a todo corpo docente, em especial ao Professor Marcelo Kamiski Lenzi e Secretária Cinthya Kuznharski, à frente da coordenação do curso.

Aos meus amigos e companheiros de pesquisa, Alexis Miguel Escorsim, Luis Ricardo Kanda, Giselle de Souza Silva, Gilvane Bueno da Paixão, Jéssica Jakubiak Bento, Fabiane Hamerski e Michael Anderson Prado.

Ao apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP – , da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – e do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCTI, bem como da Petrobras.

“Bem-aventurado o homem que encontra sabedoria, e o homem que adquire conhecimento, pois ela é mais proveitosa do que a prata, e dá mais lucro do que o ouro. Mais preciosa é do que rubis; tudo o que podes desejar não se compara a ela”.

Provérbios 3:13-15

RESUMO

Microalgas têm se destacado no cenário mundial como potencial fonte para a produção de biodiesel por apresentarem altas taxas de rendimento lipídico, cultivo intensificado e altas taxas de crescimento. A extração do óleo de microalgas é atualmente um dos principais gargalos no desenvolvimento e implantação de processos para extração e produção de biodiesel a partir desta matéria-prima. A aplicação de novas tecnologias em detrimento das já conhecidas técnicas de extração, tais como extração por prensagem ou por solventes orgânicos, é fundamental para a viabilidade técnica e econômica deste tipo de processo. Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar a extração por solvente orgânico do óleo de microalga *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom. As extrações com solvente acelerados por ultrassom foram conduzidos em um banho de ultrassom ECO-SONICS Q 59/31A, com potência máxima de 165 W. Foram estudadas as variáveis temperatura, razão entre massa de microalga e volume de solvente (hexano ou etanol) (RMV) e potência (Pb) por meio de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central. Para o planejamento experimental o tempo de extração foi fixado em 60 min. Ainda, no presente estudo foram realizadas medidas das cinéticas de extração para as diferentes condições experimentais, as quais foram correlacionadas a modelos cinéticos de extração de primeira e segunda ordem. Para comparação do rendimento lipídico, foram realizadas extrações em Soxhlet com tempo de extração de 12 horas e em triplicata. A escolha dos solventes foi em função do hexano ser utilizado como padrão para determinação de extraíveis e o etanol devido ao interesse na produção de biodiesel. A condição de máximo rendimento de extração, em termos de massa de extrato em relação à massa de microalga seca, foi de 14,65% (m/m) na condição de 100% da potência do banho, na temperatura de 30 °C e RMV de 75 mg/mL para o etanol como solvente. Para o hexano como solvente o máximo rendimento de extração foi de 2,41%, nas condições experimentais de 20% da potência do banho, temperatura de 60°C e RMV de 150 mg/mL. Para as extrações em Soxhlet com etanol e hexano os resultados dos rendimentos de extração foram de 13,08% e 1,71%, respectivamente. O etanol foi o melhor solvente considerado para operação em que a variável potência do ultrassom foi identificada como a mais significativa no processo. Para este solvente, o processo de obtenção da porção lipídica e conversão a ésteres metílicos (biodiesel) foi realizada utilizando a metodologia de Hartman & Lago modificado, sendo o melhor resultado 8,32 % (8,32 g de ésteres metílicos para cada 100 g de microalga), nas condições experimentais com Pb de 100%, Tb igual à 60°C e RVM de 150 mg/mL. O modelo de segunda ordem apresentou uma boa capacidade de correlação dos dados experimentais das cinéticas de extração, o que permitiu avaliar o comportamento do período inicial da extração, bem como a possibilidade da utilização dos dados para projeto, modelagem e simulação de novos processos baseados nestas condições operacionais.

Palavras-chave: Extração, ultrassom, microalgas, esterificação, biodiesel, etanol.

ABSTRACT

Microalgae have been pointed as a promising source for biodiesel-convertible lipid production due to their high lipid content, high productive and intensified crops. The extraction step is currently one of the main bottlenecks regarding the process development and implementation for biodiesel production from this feedstock. Development of new technologies to the detriment of already known extraction techniques, such as mechanical press or extraction with organic solvents, is the central issue to the technical and economic viability of this process. In this context, the main goal of this work was to study the oil extraction from microalgae *Chlorella pyrenoidosa* using an organic solvent in ultrasound-assisted process. The ultrasound-assisted extractions were performed using an ultrasound bath (ECO-Q Sonics 59 / 31A), with maximum power of 165 W. The variables studied were temperature, microalgae to solvent volume mass ratio (hexane and/or ethanol) (RMV) and power of the ultrasound bath (P_b) through a 2^3 factorial design with center point. In the experimental design, the extraction time was 60 min. Furthermore, kinetic of oil extraction at different experimental conditions were measured and correlated using a first and second-order model. In order to compare the lipids yield, microalgae extractions were also performed in a Soxhlet system with an extraction time of 12 h and in triplicate. Hexane is been used as the standard solvent for lipids extraction and ethanol is related to the biodiesel production processes. The highest yield extraction, in terms of mass of extract to dried microalgae mass, was 14.65% (m/m) using the ethanol as the solvent at conditions of 100% of ultrasound power, 30 °C and RMV of 75 mg/mL. Regarding the hexane, the maximum yield was 2.41%, at conditions of 20% of ultrasound power, 60 °C and RMV of 150 mg/ml. From the Soxhlet extractions with ethanol and hexane the extraction yields were 13.08% and 1.71%, respectively. The ethanol was considered the better solvent for the operating conditions studied in this work and the power ultrasound (%P) was identified as the most significant variable in this process. For this solvent, the extract to methyl ester (biodiesel) conversion process were realized by modify Hartman & Lago methodology, being the best result 8.32% (8.32 g of methyl ester by each 100 g microalgae), at experimental condition with P_b 100%, T_b equal to 60°C and RVM of 150 mg/mL. The second-order kinetic extraction model showed a good capability in correlate the experimental data, which can be used to assess the behavior of the initial period of extraction as well as the possibility of using these informations for design, modeling and simulation of new processes based on such operating conditions.

Keywords: Extraction, ultrasound, microalgae, esterification, biodiesel, ethanol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS	20
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE BIOREATOR DO TIPO RACEWAY. FONTE: BERNAN E OWENDE, 2010	26
FIGURA 3 - ESQUEMA DE FOTOBIOREATOR. FONTE: BERNAN E OWENDE, 2010	27
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS, ADAPTADO DE (HALIM <i>ET AL.</i> , 2012)	32
FIGURA 5 - EQUIPAMENTOS PARA EXTRAÇÃO SOXHLET. (A) BIOMASSA DE MICROALGA; (B) EXTRATOR SOXHLET; (C) BALÃO DE FUNDO REDONDO; (D) CONDENSADOR; (E) ALIMENTAÇÃO DE VAPORES DE SOLVENTE; (F) RETORNO DE SOLVENTE;	34
FIGURA 6- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO MECÂNICOS E NÃO-MECÂNICO PARA RUPTURA CELULA. ADAPTADO DE: HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; LEE; LEWIS; ASMAN, 2012.	36
FIGURA 7 - CAVITAÇÃO ACÚSTICA ADAPTADO DE EPIGENTEK, 2014	38
FIGURA 8 - PORPOSTA DE CADEI PRODUTIVO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE MICROALGAS. ADPTADO DE ZUH <i>ET AL.</i> , 2014.....	42
FIGURA 9 - CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO SOXHLET UTILIZADO.....	45
FIGURA 10 - ETAPAS EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRAASSOM. PREPARO DA AMOSTRA SECA (A); MISTURA COM SOLVENTE DE INTERESSE (B); EXTRAÇÃO EM ULTRASSOM (C); FILTRAÇÃO (D); CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO (E);.....	46
FIGURA 11 - REDUÇÃO DE ESCALA E AVALIAÇÃO DE MUDANÇA DE POSIÇÃO NA BANDEJA EM RELAÇÃO AO TEOR DE EXTRATO OBTIDO.....	48
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE HARTMAN & LAGO MODIFICADO: PREPARO DE AMOSTRA (A); AQUECIMENTO DURANTE REAÇÃO (B); FINALIZAÇÃO COM COMPLETA SEPARAÇÃO DE FASES (C).....	51

FIGURA 22 - GRÁFICO DE PARETO DE EFEITOS PADRONIZADOS PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE PARA VARIÁVEL RENDIMENTO ETANOL (%), COM ERRO PURO = 2,58	58
FIGURA 32 - GRÁFICO DE PARETO DE EFEITOS PADRONIZADOS PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ UTILIZANDO HEXANO COMO SOLVENTE PARA VARIÁVEL RENDIMENTO HEXANO (%), COM ERRO PURO = 0,63.....	59
FIGURA 33 - TEOR DE EXTRATO PARA AS REPETIÇÕES TESTADAS E MEDIDAS ENTRE TESTES PARA REDUÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO.....	61
FIGURA 34 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO EM ULTRASSOM EM FUNÇÃO DA POTÊNCIA AVALIADA EM DIFERENTES RMV (ETANOL) UTILIZADO, 150 MG/ML (A) E 75 MG/ML (B).....	64
FIGURA 35 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 0%.....	65
FIGURA 36 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 20%.....	65
FIGURA 37 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 60%.....	66
FIGURA 38 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 100%.....	66
FIGURA 39 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 MG/ML E PB = 0%.....	67
FIGURA 22 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 MG/ML E PB = 20%.....	68
FIGURA 41 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 MG/ML E PB = 60%.....	68
FIGURA 42 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 MG/ML E PB = 100%.....	69
FIGURA 43 - TEOR DE ÉSTER DOS EXTRATOS EM ETANOL OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRASSOM VIA GRAVIMETRIA.....	74
FIGURA 44 - COMPARAÇÃO ENTRE RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E DO PROCESSO OBTIDO PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA COM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE QUANTIFICADO POR GRAVIMETRIA.....	74

FIGURA 45 - TEOR DE ÉSTER DOS EXTRATOS EM ETANOL OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRASSOM VIA CROMATOGRAFIA GASOSA.	76
FIGURA 46 - COMPARAÇÃO ENTRE RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E DO PROCESSO OBTIO PARA CADA CONSIÇÃO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO ASSISSTIDA COM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE QUANTIFICADO POR CROMATOGRAFIA GASOSA	77
FIGURA 47 - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA PARA AVALIAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DA AMOSTRA ET 1 A	79
FIGURA 48 - APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA TESTE DE CLARIFICAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGA EM LEITO FIXO UTILIZANDO CARVÃO ATIVADO COMO ADSORVENTE	81
FIGURA 49 - ALÍQUOTA DE EXTRATOS SECOS APÓS SUBMISSÃO AO PROCESSO DE CLAREAMENTO POR ADSORÇÃO EM LEITO FIXO UTILIZANDO CARVÃO ATIVADO, NA ORDEM BAIXO PARA CIMA DA DIREITA PARA ESQUERDA	82
FIGURA 50 - CURVA DE ADSORÇÃO PARA SOLUÇÃO DE EXTRATO EM ETANOL UTILIZANDO CARVÃO ATIVO COMO ADSORVENTE E VAZÃO DE 3ML/MIN	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ALGAS EM BASE SECA (%).....	21
TABELA 2 - ESPÉCIES EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO LIPÍDICO	22
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE PRODUÇÃO EM FOTOBIOREATORES E TANQUES ABERTOS.....	28
TABELA 4 - PRODUÇÃO DE ENERGIA E EFICIÊNCIA DE FONTOSSÍNTE DE DIFERENTES BIOMASSAS.....	40
TABELA 5- VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	47
TABELA 6 – PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA EMPREGADA NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÉSTERES GRAXOS.	52
TABELA 7 – DADOS PARA UMIDADE E CINZAS	53
TABELA 8 – TEOR DE EXTRAÍVEIS EM ETANOL.....	54
TABELA 9 - TEOR DE EXTRAÍVEIS EM HEXANO	54
TABELA 10 – CONDIÇÕES DE CADA UM DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO, E ORDEM ALEATÓRIA DE REALIZAÇÃO.....	55
TABELA 11- RESULTADOS EM TERMOS DE EXTRATO OBTIDO, PARA AS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL, UTILIZANDO ETANOL E HEXANO	55
TABELA 12 – PARÂMETROS DAS EQUAÇÕES DOS MODELOS MATEMÁTICOS	56
TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS RESPOSTAS AO USO DE ETANOL E HEXANO COMO SOLVENTES.....	57
TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MELHORES CONDIÇÕES OBTIDAS PELAS DUAS METODOLOGIAS TESTADAS, PARA OS SOLVENTES ETANOL E HEXANO	59
TABELA 15 - VALORES OBTIDOS DE TEOR DE EXTRATO PARA EXTRAÇÕES REALIZADAS EM DIFERENTES POSIÇÕES DO BANHO DE ULTRASSOM.....	60
TABELA 16 - TEOR DE EXTRATO MÉDIO E DESVIO PADRÃO DO ESTUDO CINÉTICO DE EXTRASSÃO DE MICROALGA ASSISTIDO EM ULTRASSOM	62

TABELA 17 – CONSTANTES DE MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM PARA EXTRAÇÕES ASSISTIDAS EM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE.	62
TABELA 18 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO LINEAR E CONSTANTES DE MODELO CINÉTICO DE SEGUNDA ORDEM PARA EXTRAÇÕES ASSISTIDAS EM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE	62
TABELA 19 - VALORES DE DESVIO RELATIVO MÉDIO ABSOLUTO (AMD%) E DO DESVIO QUADRÁTICO MÉDIO (RMSE), PARA OS MODELOS DE EXTRAÇÃO DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM PARA AS CONDIÇÕES DE RMV E PB AVALIADAS	69
TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ESTERIFICAÇÃO PARA AMOSTRAS OBTIDAS EM ETANOL.	70
TABELA 21 - COMPARAÇÃO ENTRE RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO E TEOR DE ÉSTER, E O CÁLCULO DO RENDIMENTO DO PROCESSO	72
TABELA 22 - QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS VIA CROMATOGRAFIA GASOSA E UTILIZAÇÃO DE PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	75
TABELA 23 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES EM RELAÇÃO AO EXTRATO OBTIDO EM DIVERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DO PROCESSO EM RELAÇÃO A MASSA INICIAL DE MICROALGA UTILIZADA.....	77
TABELA 24 - LEITURAS DE ABSORBÂNCIA EM COMPRIMENTOS DE ONDA DE 412 NM E 664 NM DAS ALÍQUOTAS DA SOLUÇÃO DE EXTRATO SUBMETIDA AO PROCESSO DE CLAREAMENTO POR ADSORÇÃO.....	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO BIBIOGRÁFICA	20
2.1 MICROALGAS	21
2.1.1 Formas de cultivo.....	23
2.1.2 Sistemas de cultivo	25
2.1.3 Produtos derivados	29
2.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA.....	29
2.2.1 Extração com solventes orgânicos	31
2.2.1.1 Extração Soxhlet.....	33
2.2.2 Métodos de ruptura.....	34
2.2.3 Extração assistida por ultrassom	35
2.3 BIODIESEL DE MICROALGAS.....	39
2.4 ASPECTOS ECONÔMICOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 MICROALGA UTILIZADA.....	43
3.2 TEOR DE UMIDADE	43
3.3 TEOR DE CINZAS	44
3.4 EXTRAÇÃO SOXHLET	44
3.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	45
3.6 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	47
3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO.....	49
3.8 ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	50
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES VIA CROMATOGRAFIA GASOSA.....	52
4 RESULTADOS	53
4.1 UMIDADE E CINZAS	53

4.2 EXTRAÇÕES EM SOXHLET	54
4.3 EXTRAÇÕES ASSISTIDAS EM ULTRASSOM.....	55
4.4 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO: EXPERIMENTOS E MODELAGEM	60
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTER	70
4.5.1 Método gravimétrico	70
4.5.2 Método cromatográfico	74
4.6 PURIFICAÇÃO DE EXTRATO - REMOÇÃO DE CLOROFILA	80
4.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	83
5 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A busca constante por fontes renováveis de energia em nível mundial pode ser explicada por dois motivos principais, o possível fim das reservas de petróleo existentes em todo o planeta e a crescente preocupação ambiental causada pela emissão dos gases resultantes da combustão e seus efeitos. O impacto causado por um possível fim das fontes de petróleo, principal representante dos combustíveis fósseis, pode ser estimada quando avalia-se a matriz energética mundial, que segundo Brennan e Owende (2010) é composta por 88% de energia fóssil (petróleo, carvão e gás natural), 5% referente à energia nuclear e 6% de energia provenientes de hidroelétricas. Adicional a este fator, a tendência crescente e exponencial do uso de combustíveis à base de petróleo contribuem significativamente para o agravamento dos danos ambientais, resultantes principalmente do efeito estufa causado pelas altas taxas de emissão de dióxido de carbono na atmosfera (FOLEY *et al.*, 2011).

Segundo a *U.S Energy Information Administration* (2006), citado por Brennan e Owende (2010), as emissões de CO₂ no ano de 2006 chegaram à 29 Gton, enquanto a capacidade de absorção de todo o globo terrestre é de apenas 12 Gton. Este acúmulo de CO₂ tem contribuído diretamente para o aumento gradual da temperatura média na atmosfera terrestre, e por consequência nos fenômenos de derretimento de calotas polares e elevação do nível hídrico marinho (RAMOS *et al.*, 2011).

Uma verdadeira corrida de desenvolvimento tecnológico e investigativas das melhores e mais promissoras fontes de energia à disposição foi iniciada tendo como grande meta a busca de fontes renováveis, de fácil manejo, de fácil adaptação aos diversos climas e microclimas de cada região.

Dentre as fontes de energia renováveis, alternativas ao uso dos combustíveis fósseis, destacam-se o uso de energia provenientes das marés, correntes de ar, solar e biomassa (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011). De maneira a sobressair em cenário mundial e nacional o uso de biomassa para produção de biodiesel, oriundo de oleaginosas tais como soja, milho, pinhão manso, mamona e dendê. Este situado em um estágio mais avançado de desenvolvimento, com usinas

instaladas e em operação, quando comparado aos demais produtos originados de biomassa (CORDEIRO, 2008).

Biodiesel é por sua vez definido com uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, produzido pela reação de um óleo ou gordura com um álcool na presença de um catalisador (CRUZ *et. al*, 2013).

Segundo Schuchardt *et al.* (1998) citado por Cordeiro *et al.* (2011), quando tratado em nível industrial, a produção de biodiesel é feita por rota alcalina em meio homogêneo, de maneira que para ter sua eficiência justificada, o óleo deve apresentar como características baixo teor de ácidos graxos livre e baixo teor de umidade, para evitar o consumo do catalisador e formação de emulsões, o que limita à certas matérias-primas que abastecem este mercado.

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) em seu boletim mensal do biodiesel (Outubro de 2014), a produção de biodiesel no Brasil no último ano foi de aproximadamente 3×10^6 m³, porém com capacidade instalada de cerca de 8×10^6 m³. As matérias-primas base da produção nacional são o óleo de soja 73,72%, gordura bovina 20,29 %, o óleo de algodão 4,04% e 1,75% é proveniente de outras fontes.

A utilização de tais matérias-primas levantou grandes polêmicas como: a destinação do espaço utilizado da cultura de tais vegetais, incentivo a monocultura e ameaça a segurança alimentar (DEMIRBAS E DEMIRBAS, 2011). Além disto, segundo Chisti (2007), as oleaginosas tradicionais não podem contribuir de maneira significativa para a substituição dos derivados de petróleo, devido as grandes proporções de áreas cultiváveis que seriam necessárias para atender a demanda total, por vezes maiores do que o existente. Além disso, para a produção eficiente de biodiesel faz-se necessária a atenção não apenas para a seleção de uma dada matéria prima, uma vez em que o processo de maneira macro deve ser analisada.

Seja qual for a espécie de oleaginosa escolhida como insumo, deverá atender o maior número de requisitos tais como facilidade de cultivo em diferentes climas, o processo de extração de óleo a ser utilizado, metodologia de conversão, refino do produto, destinação de efluentes e preços atrativos e concorrentes aos dos derivados de petróleo.

É neste contexto que o potencial produtor das microalgas surge como fonte de lipídeos para a produção de biodiesel. Além de não comprometer a produção de alimentos e outros produtos derivados de oleaginosas, apresentam como vantagens,

reduzida área de cultivo (cultivo intensificado) e alto teor de óleo em massa seca, flexibilidade geográfica para cultivo e altas taxas de crescimento alta podendo dobrar sua biomassa em 24h. Ainda, destaca-se possibilidade de utilizar água residual ou salobra (espécies marinhas) dispensando o consumo de água doce, bem como a possibilidade de aproveitamento dos coprodutos para a alimentação animal, fertilizantes ou ainda para a geração de energia. Além da característica desta matéria-prima apresentar comumente de 20% à 50% de sua massa seca composta por porção lipídica (SOH E ZIMMERMAN, 2011; CHISTI, 2007).

Apesar das microalgas apresentarem grande potencial como fonte lipídica para produção de biodiesel, atualmente a dificuldade encontrada é em relação ao desenvolvimento e otimização de novos processos, como alternativas de engenharia que viabilizem técnica e economicamente a produção de biodiesel a partir desta matriz. Neste contexto, o desenvolvimento de uma via eficiente para a extração lipídica de microalgas e a otimização das variáveis de processo são fundamentais (HALIM *et al.*, 2012).

A técnica empregada com maior frequência para extração deste óleo é a extração com solventes orgânicos, onde hexano, clorofórmio e metanol são comumente utilizados. Tal prática remete a geração de efluentes com alto potencial de risco para o meio ambiente e à saúde humana, além de extrair frações não desejadas como hidrocarbonetos, fosfolipídios e pigmentos (SOH E ZIMMERMAN, 2011; TANG *et al.*, 2011).

A busca de um processo adequado e tecnicamente viável para extração do óleo de microalga envolve desafios tais como, a aplicação de metodologias que demandem menores quantidades de solventes orgânicos e que possibilitem atingir o maior rendimento possível. Dentre estas, pode-se destacar a aplicação de fluidos super ou subcríticos, micro-ondas, processos enzimático e a extração assistida em ultrassom (ARAUJO *et al.*, 2013; CHISTI, 2007).

Metodologias empregando técnicas de ultrassom para extração lipídica de microalgas são classificadas como pré-tratamento, no intuito de sensibilizar e romper a parede celular e posterior extração, ou a utilização deste recurso como alternativa aos processos convencionais, na presença ou não de um solvente orgânico. O efeito do ultrassom dá-se pela cavitação provocada por ondas sônicas, em ciclos rápidos de compressões e descompressões, e altas temperaturas, tornando o interior da microalga acessível (ADAM *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012).

Na literatura, têm sido reportados alguns trabalhos que envolvem a extração de óleo de microalgas em sistemas assistidos por ultrassom (ADAM *et al.*, 2012; BALASUBRAMANIAN *et al.* 2013; SILVA, 2013), no entanto tanto os fenômenos de extração do material lipídico quanto a avaliação do real rendimento dos extratos obtidos para a conversão a biodiesel são ainda carentes de adequado entendimento e otimização. Neste sentido, o presente trabalho visa o estudo da aplicação de ultrassom para a extração de óleo de microalgas como uma alternativa à extração da fração lipídica (óleo) de microalgas em meio alcoólico e a subsequente redução do tempo de processo e a possibilidade de atender de imediato a etapa seguinte - a esterificação dessa fração lipídica para a produção de ésteres (biodiesel).

A partir disso, o objetivo geral e específicos do presente trabalho podem ser delineados conforme apresentados a seguir.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo visa a obtenção da fração lipídica de microalgas a partir de extração com etanol e hexano assistida por ultrassom para aplicação na produção de biodiesel. Para tal, os seguintes objetivos específicos são elencados.

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar a influência das variáveis de processo: razão massa de microalga e volume de solvente (RMV) (mg/mL), potência do banho de ultrassom (Pb) e temperatura de extração (Tb);
- Avaliar o potencial de esterificação do extrato obtido para produção de biodiesel – estudo de rendimento do processo;

- Comparar a eficiência do processo proposto com a metodologia de extração tradicional em *Shoxlet*;
- Medir de dados cinéticos da extração da porção lipídica de microalga;
- Aplicar modelos matemáticos aos dados experimentais de.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica tem como intuito apresentar as diferentes etapas de produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas, em que é priorizada a descrição da etapa de extração e as diferentes metodologias aplicadas, bem como alternativas de processo. O processo de forma general pode ser representado pela (FIGURA 1).

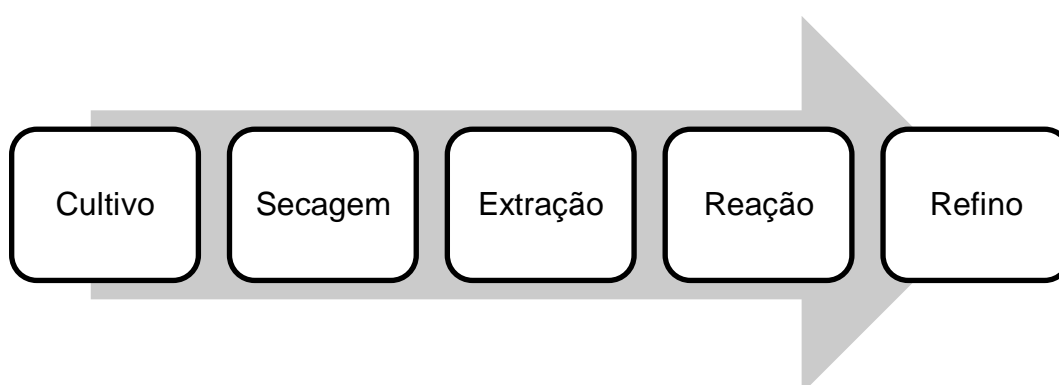


FIGURA 1 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BODIESEL DE MICROALGAS

As microalgas de maneira geral, são cultivadas em fotobioreatores ou em tanques abertos (*raceways*), concentradas por filtração, centrifugação, floculação ou aglomeração para remoção água. Então tal matéria prima é seca, moída e pré-tratada por moinhos de bolas, micro-ondas, ou homogeneização em alta-pressão para aumentar a transferência de massa durante a extração. Tais pré tratamentos normalmente aumentam a eficiência da extração pela ruptura da estrutura celular. No que lhe diz respeito, as extrações podem ser feitas utilizando métodos alternativos, sejam químicos ou físicos. Químicos usualmente empregam solventes orgânicos como hexano e metanol, e físicos prensas mecânica, métodos eletromagnéticos, liquefação, Soxhlet, fluídos supercríticos, ultrassom (BAHADAR E KHAN, 2013).

2.1 MICROALGAS

Microalgas são microrganismos unicelulares compostos majoritariamente por lipídeos, carboidrato e proteínas, diferenciando-se a porção de cada uma das frações em função da espécie e parâmetros de cultivo, como exemplos apresentados na TABELA 1. Estas podem ser cultivadas em águas doce ou salgada, cuja porção lipídica é semelhante aos lipídeos de origem vegetal, diferindo por conter componentes de alto grau de insaturação (DEMIRBAS E DEMIRBAS, 2011; FOLEY *et al.*, 2011).

Para Chisti 2007, “microalgas são fábricas movidas a energia solar que convertem dióxido de carbono em potenciais biocombustíveis, alimentos e suprimentos de alto valor”.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ALGAS EM BASE SECA (%)

Espécie	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)	Ácidos Nucleicos (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 – 60	10 – 17	12 – 14	3 – 6
<i>Scenedesmus quadricaula</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8 – 18	21 – 52	16 – 40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 – 58	12 – 17	14 – 22	4 – 5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6 – 20	33 – 64	11 – 21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39 – 61	14 – 18	14 – 20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28 – 45	25 – 33	22 – 38	1 – 2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 – 39	40 – 57	9 – 14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46 – 63	8 – 14	4 – 9	2 – 5
<i>Spirulina máxima</i>	60 – 71	13 – 16	6 – 7	3 – 4,5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaema cylindrica</i>	43 – 56	25 – 30	4 - 7	-

FONTE: DEMIRBAS E DEMIRBAS, 2011

O óleo de microalgas contém ácidos graxos saturados e insaturados. São estimadas em microalgas as seguintes proporções: 36% oleico (18:1), 15% palmítico (16:0), 11% esteárico (C18:0), 8,4% iso 17:0, e 7,4% linoleico (18:2). A alta proporção de ácidos graxos saturados e monoinsaturados em microalgas é considerado bom para a qualidade dos combustíveis, em que a polimerização do combustível durante a combustão pode ser menor de que ocorreria com ácidos graxos poli-insaturados (DEMIRBAS E DEMIRBAS, 2011).

Dentre as espécies, destacam-se a *Botryococcus braunii*, a *Chlorella sp*, e a *Nannochloropsis sp*, com maior percentual de óleo em relação ao seu peso seco (CHISTI, 2007).

TABELA 2 - ESPÉCIES EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO LIPÍDICO

	Espécie de microalga	Conteúdo lipídico (%, m/m)	Produtividade lipídica (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
Água doce	<i>Botryococcus sp</i>	25,0–75,0	–
	<i>Chaetoceros muellri</i>	33,6	21,8
	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6–16,4/39,8	17,6
	<i>Chlorella emersonii</i>	25,0–63,0	10,3–50,0
	<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6–57,8	1214
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0–22,0	44,7
	<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0–58,0	11,2–40,0
	<i>Chlorella sp.</i>	10,0–48,0	42,1
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	–
	<i>Chlorella sp.</i>	18,0–57,0	18,7
	<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7
	<i>Ellipsoidion sp.</i>	27,4	47,3
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	–
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0–55,0	–
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9–18,4	35,1
	<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6–21,1	40,8–53,9
Água Salgada	<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0
	<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	–
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7–71,0	–
	<i>Dunaliella sp.</i>	17,5–67,0	33,5
	<i>Isochrysis galbana</i>	7,0–40,0	–
	<i>Isochrysis sp.</i>	7,1–33	37,8
	<i>Nannochloris sp.</i>	20,0–56,0	60,9–76,5

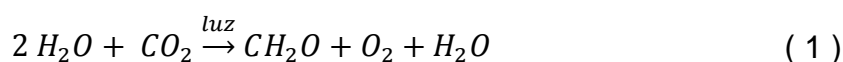
Espécie de microalga	Conteúdo lipídico (%, m/m)	Produtividade lipídica (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7–29,7	84,0–142,0
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0–53,0	60,9–76,5
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0–65,0	90,0–134,0
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2
<i>Phaeodactylum tricormutum</i>	18,0–57,0	44,8
<i>Spirulina platensis</i>	4,0–16,6	–

2.1.1 Formas de cultivo

Microalgas podem ser cultivadas de três diferentes formas, autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (CRUZ *et al.*, 2013).

O modo autotrófico, conhecido também como fotoautotrófico ou fototrófico, as microalgas absorvem luz solar, assimilam dióxido de carbono (CO₂) do ar como fonte de carbono e nutrientes do ambiente aquático para produção de polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos através da fotossíntese (CRUZ *et al.*, 2013; BRENNAN E OWENDE, 2010).

Este, que por sua vez é considerado como meio de cultivo promissor pelo fato de transformarem um resíduo, CO₂, oriundo principalmente de unidades fabris, em oxigênio, conforme EQUAÇÃO (1), produtos de interesse à sociedade, e por apresentarem contaminação ao meio de cultivo menos severas. As microalgas cultivadas neste regime, apresentam conteúdo lipídico variável, entre 5 % e 68 %, tendo como exemplo a produção de 179 mg L⁻¹ d⁻¹ de lipídeo pela *Chlorella sp.* utilizando aeração com concentração volumétrica de CO₂ de 2 %, e taxa de renovação de 0,25 vvm (AMARO *et al.*, 2011).



No entanto, a produção fototrófica é limitada pela exposição solar apenas no período diurno e sob dependência do ciclo sazonal restringindo o cultivo a locais de maior incidência solar (BERNNAN E OWENDE, 2010).

A forma heterotrófica também tem sido utilizada com sucesso para produção de biomassa de certas espécies de microalgas e metabólitos, pelo fato de não dependerem exclusivamente de luz para seu cultivo, mas utilizam fontes orgânicas de carbono em ausência de luz. Tal tipo de cultivo tem como principal objetivo a resolução de problemas associados com disponibilidade de luz limitada. Neste processo microalgas crescem em substratos de carbono orgânico como glucose, acetato, glicerol, frutose, sacarose, lactose, galactose e manose em biorreatores agitados ou fermentadores (BRENNAN E OWENDE, 2010; AMARO *et al.*, 2011). Tal tipo de cultivo permite a possibilidade de aumento de escala dos biorreatores de maneira simples, desde pequenas superfícies e razões volumétricas. Estes sistemas proporcionam um alto grau de crescimento, como relatado por Liang *et al.*, (2009), em que na mudança de meio de cultivo fototrófico para heterotrófico da microalga *Chlorella protothecoides*, um aumento de 40% no teor lipídico foi obtido. Apesar de apresentar baixo custo de colheita, devido a alta concentração do meio, a quantidade energética produzida é menor do que a necessária para o cultivo, devido a necessidade inicial de conversão de energia fotosintética em recurso de carbono para o meio heterotrófico, além de apresentar problemas relacionados a susceptibilidade a contaminação, e o custo dos recursos de carbono orgânico, os quais são grandes preocupações do ponto de vista comercial (BRENNAN E OWENDE, 2010; AMARO *et al.*, 2011).

Muitas espécies de algas ou microalgas são capazes de utilizar tanto processos metabólicos autotróficos e heterotróficos para crescimento, denominadas mixotróficas, ou seja, são capazes de realizar fotossíntese bem como ingestão de materiais orgânicos (substrato), o que possibilita a redução de perda de biomassa durante fase com incidência e sem incidência de luz para produção. Alguns exemplos de microalgas que dispõem deste mecanismo de desenvolvimento são cianobactérias *Spitulina platensis*, e alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (BRENNAN E OWENDE, 2010).

Tanto os modos heterotróficos e mixotróficos, dependentes de substratos de carbono orgânico para seu desenvolvimento, apresentam uma preocupação adicional em relação à competição do uso deste recurso destinado também à alimentação humana (CRUZ *et al.*, 2013).

Segundo Brennan e Owende (2010) e Chisti (2007), a única metodologia atualmente economicamente viável para produção em escala industrial é a

autotrófica (fotoautotrófica), em que está incluído o cultivo em reatores abertos do tipo tanques e fotobioreatores. Estes autores ressaltam que sua viabilidade técnica do emprego desta matéria-prima depende das características de cada espécie de microalga selecionada, condições climáticas e custos de produção.

2.1.2 Sistemas de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser feito em biorreatores, definido como um sistema no qual a conversão biológica é obtida e pode ser classificado como de sistemas abertos ou fechados (MATA *et al.*, 2010).

Reatores do tipo aberto podem ser distribuídos em águas naturais, tais como lagos, lagoas e tanques, e ainda em águas artificiais, sendo o tipo *raceway* (pista de corrida) o mais utilizado (BRENNAN E OWENDE, 2010).

Raceways, como representado na FIGURA 2 são tipicamente produzidos em um circuito oval fechado, construídos normalmente em concreto, com profundidade variando entre 20 e 50 cm, e sistema de recirculação para estabilizar o crescimento e produtividade. Em regime contínuo, meio de cultivo e nutrientes são alimentados à jusante da pá notória, e circulados pelo circuito *raceway* até o ponto de colheita. A pá é movimentada e operada para que não haja sedimentação, a necessidade de CO₂ normalmente é atendida pelo contato da superfície com o ar, porém aeradores submersos podem ser instalados (BRENNAN E OWENDE, 2010).

Este sistema possui como vantagens, quando comparados aos fotobioreatores, menor custo para construção e operação, maior durabilidade, grande capacidade instalada, não compete necessariamente com áreas de produção alimentícia, pode ser instalada às margens destas áreas, e é necessária baixa aplicação de energia nestes tipos de cultivo, bem como manutenção regular e processo de limpeza facilitados (BRENNAN E OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).

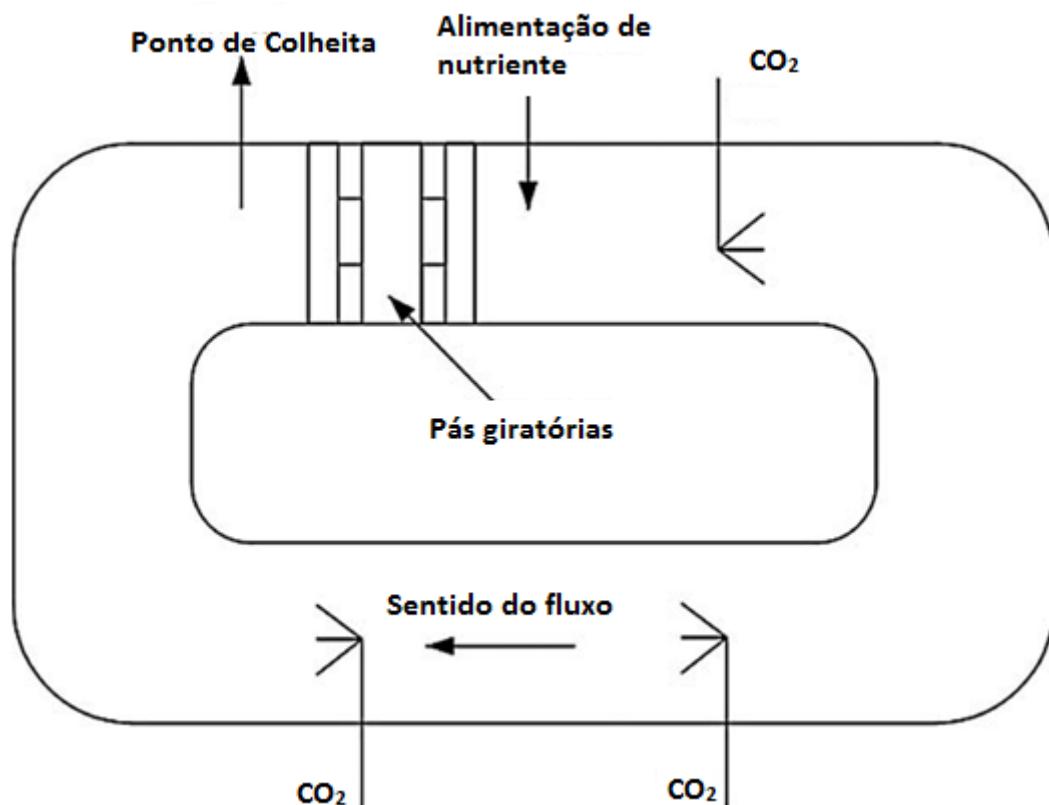


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE BIOREATOR DO TIPO RACEWAY. FONTE: BERNAN E OWENDE, 2010

O sistema de cultivo em *Raceways* apresenta como desvantagens a alta susceptibilidade às condições climáticas, não permitindo o controle de temperatura da água, evaporação e iluminação, o que implica diretamente na dificuldade da manutenção da densidade celular desejada. Sendo também frágil à contaminação por outras microalgas e bactérias, e normalmente ocupa largas áreas quando comparado a biorreatores fechados e a limitada taxa de transferência de massa devida à baixa concentração de CO_2 no ar atmosférico (MATA *et al.*, 2010; AMARO *et al.*, 2011).

Por sua vez, sistemas de produção fechados têm como característica suprir as deficiências do sistemas aberto, no que diz a respeito da possibilidade de cultivo de uma única espécie de microalga por longos períodos de tempo e prover proteção dos riscos de contaminação por agentes externos, bem como há a possibilidade de otimização do sistema de acordo com as características biológicas e fisiológicas de cada espécie cultivada (BERNNAN E OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).

Estão inclusos no sistema fechado os reatores tubulares, de placas planas e fotobiorreatores de coluna. Fotobiorreatores consistem de tubos plásticos ou de vidros

arranjados na horizontal, vertical ou inclinados, com diâmetros máximos normalmente de 10 cm, tal limitação deve-se pela luz não penetrar profundamente em culturas densas, que é necessário para garantir a produtividade do fotobioreator. Cultura de algas são recirculadas de forma mecânica, bombas, ou com insuflação de ar, que permite a troca gasosa no meio além de promover mistura do meio (BERNNAN E OWENDE, 2010).

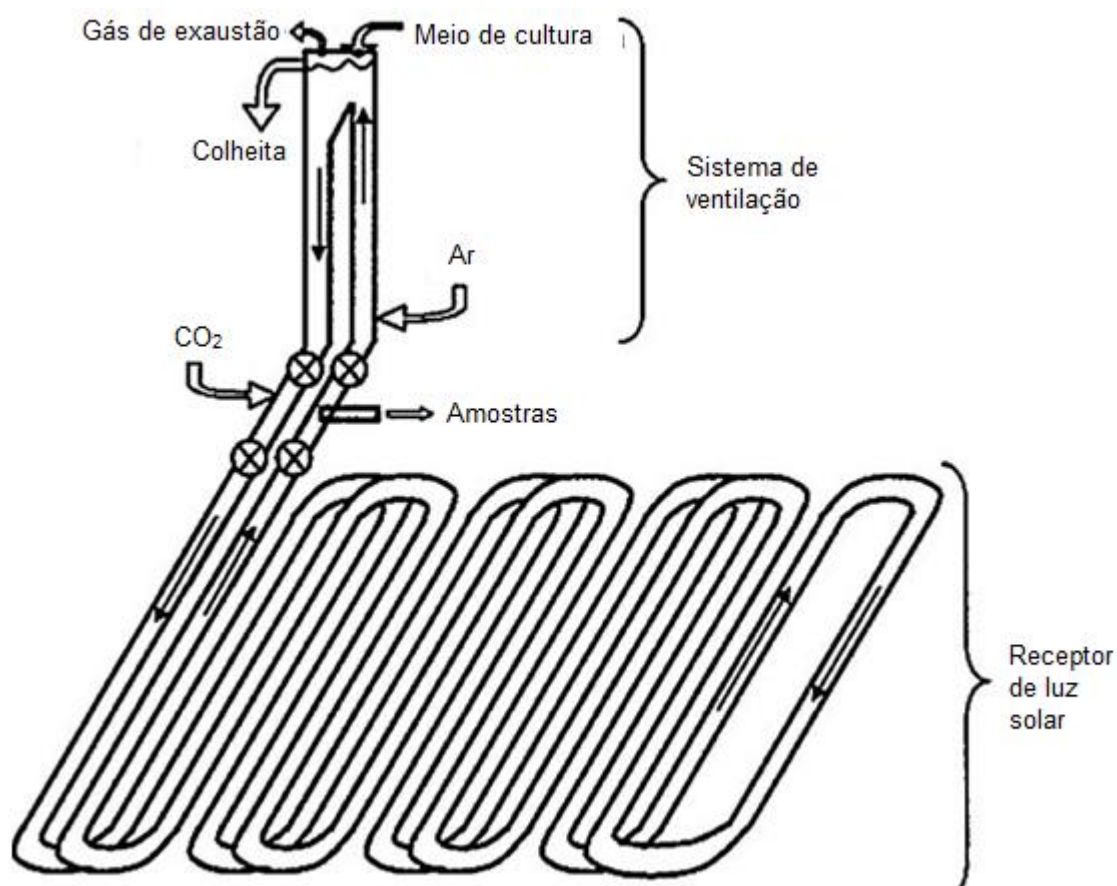


FIGURA 3 - ESQUEMA DE FOTOBIOREATOR.
FONTE: BERNNAN E OWENDE, 2010

Os sistemas de cultivo em fotobioreatores oferecem oportunidade de otimização em relação a exposição à luz, melhor eficiência de mistura, altas taxas de transferência de massa, melhor controle das condições de crescimento (como pH, temperatura, mistura, CO_2 e O_2), compactos e de fácil operação, previne evaporação, oferece um ambiente mais protegido e seguro (BERNNAN E OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).

Para Mata *et al.* (2010) não é esperado que os fotobioreatores tenham grande destaque no futuro próximo devido as dificuldades de controle de

sobreaquecimento, bio-incrustação, acumulação de oxigênio, alto custo de construção e operação, e destruição celular causada por cisalhamento. Para Chisti (2007), outra limitação está relacionado ao comprimento dos tubos devida a remoção de oxigênio necessária.

A comparação entre as duas diferentes metodologias de cultivo são dependentes de muitos fatores, dos quais incluem espécie de microalga e método de controle de produtividade, assim comumente são utilizados parâmetros de produtividade volumétrica (g/L d), produtividade por área (g/m² d), e produtividade por superfície iluminada para (g/m² d) para melhores comparações de maneira que as duas vias não podem ser consideradas competitivas, a não ser com intervenção de engenharia genética (MATA *et al.*, 2010).

A TABELA 3 mostra a comparação entre os dois diferentes tipos de biorreatores para uma produção anual de 100 ton/ano, com mesmo consumo de dióxido de carbono e em condições ótimas de produção em larga escala. Segundo Chisti (2007), ambos são viáveis tecnicamente, e já testados em instalações similares aos dados relatados. Fotobiorreatores produzem uma quantidade superior de óleo quando comparado a Raceways, já que sua produtividade volumétrica é superior a 13 vezes aos sistemas abertos. Outro ponto de destaque diz a respeito do custo para concentração da biomassa produzida, no qual o custo para os sistemas fechados representa apenas uma fração do valor necessário para sistemas abertos, e o número de unidades produtivas necessárias destaca que fotobiorreatores necessitam de menos área para o cultivo desta classe de vegetais.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE PRODUÇÃO EM FOTOBIOREACTORES E TANQUES ABERTOS

Variável	Fotobiorreataor	Raceways
Produção anual de biomassa (kg)	100.000	100.000
Produtividade volumétrica (kg m ⁻³ d ⁻¹)	1,535	0,117
Produtividade por área (kg m ⁻² d ⁻¹)	0,0480,072	0,035
Concentração de biomassa no meio de cultivo (kg m ⁻³)	4,00	0,14
Taxa de diluição (d ⁻¹)	0,384	0,250
Área necessária (m ²)	5681	7828
Rendimento em óleo (m ³ /ha)	136,9	99,4

Variável	Fotobioreator	Raceways
	58,7	42,6
Consumo anual CO ₂ (kg)	183,333	183,333
Geometria do sistema	132 tubos paralelos; 80 m de comprimento; 6 cm de diâmetro;	978 m ² /tanque; 12 m de largura; 82 m de comprimento; 30 cm de profundidade;
Número de unidade	6	8

FONTE: CHISTI (2007)

2.1.3 Produtos derivados

Além do biodiesel outros biocombustíveis e produtos podem ser obtidos tendo como matéria-prima microalgas. Segundo Bahadar e Kan (2013), entre os biocombustíveis possíveis de serem produzidos estão o bio-hidrogênio, que hoje é produzido a partir de gás natural e de hidrocarbonetos pesados como nafta, biometanol, bioetanol o qual tem menor consumo energético para produção em comparação ao biodiesel, e bio-hidrocarbonetos.

A biomassa de microalgas também é utilizada para nutrição humana, sendo restrito a espécies específicas tais como *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella*, sendo vendida em tabletes ou em pó para aditivo alimentar, sendo ricas em proteínas; Nutrição animal e aquicultura, espécies *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* podem ajudar no controle de peso e melhora na fertilização; como biofertilizantes; e fonte de ácidos graxos poli-insaturado (BRENNAN E OWENDE, 2010).

2.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA

Dentre todas as etapas para a produção de biodiesel de microalgas a extração destaca-se como etapa estratégica e valiosa para o desenvolvimento de

processos com custo efetivo e eficiente (ADAM *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2011). Opondo-se ao consenso dado por muito tempo para a indústria e profissionais da área química que a chave de todos os processos se dá na reação ou no reator, quando tratado o processo de obtenção de biodiesel de microalgas, antes mesmo da etapa de reação (transesterificação) é necessária a matéria-prima, extrato rico em lipídeos. A grande dificuldade envolvida com o uso de microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis é o acesso, ou liberação da porção lipídica intracelular, motivado pela necessidade de ruptura da parede celular, de maneira que o processo viabilize uma alternativa econômica e energeticamente viável (SCOTT *et al.*, 2010 citado por ARAUJO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2010).

Os diferentes processos de extração podem ser classificados como químicos ou físicos, sendo químicos aqueles que fazem uso de solventes orgânicos. Outros métodos incluem prensas, métodos eletromagnéticos, liquefação direta, extração em Soxhlet, extração supercrítica, ultrassom e assistida por micro-ondas, ou ainda a combinação de métodos químicos e físicos. Após o processo de extração, a mistura é submetida a separação líquido-sólido (HALIM *et al.*, 2011 citado por BAHADAR E KAHN, 2013; ADAM *et al.*, 2012).

As técnicas empregadas com maior frequência para extração deste óleo é a extração com solvente orgânico, como extração em Soxhlet com hexano, método Bligh e Dyer (mistura clorofórmio/metanol), e metanol, o que remete a geração de efluente com alto potencial de risco para o meio ambiente e à saúde humana. Além de extrair juntamente frações não desejadas como hidrocarbonetos, fosfolipídios e pigmentos (ADAM *et al.*, 2012; SOH E ZIMMERMAN, 2011).

Um solvente ideal para extração deve apresentar elevada afinidade com lipídeos, especificamente acilgliceróis, de maneira a reduzir a co-concentração de contaminantes não lipídicos e facilitar a conversão em biodiesel. Além disto, deve ser volátil para facilitar a separação do óleo cru, e suas características devem garantir a completa extração de lipídeos neutros, sendo que solventes polares e apolares à microalgas em práticas laboratoriais. Os solventes que tem sido recentemente estudados para a extração lipídica de microalgas são n-hexano, etanol, 1-butanol, DBU (1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene), dimetil éter, e combinações como clorofórmio/metanol, n-hexano-etanol, n-hexano/isopropanol, entre outros (NETO *et al.*, 2013).

O etanol tem sido considerado como solvente alternativo, devido ao seu relativo baixo custo, uma vez que pode ser obtido a partir de uma gama de materiais via fermentativa. Apresenta limites de exposição a saúde ocupacional maiores em relação ao hexano (1000 ppm para 50 ppm), também a toxicidade na alimentação animal que utiliza a biomassa residual pode ser eliminada (SAXENA *et al.*, 2011).

Mesmo dentro uma série de alternativas possíveis para o processamento de biomassa proveniente de microalgas, a sua aplicação em escalas maiores não está claramente estabelecida, sendo as metodologias de extração com solventes orgânicos as mais viáveis de serem aplicadas até o presente momento (OLMSTEAD *et al.*, 2013).

2.2.1 Extração com solventes orgânicos

Solventes líquidos são governados pelo princípio que semelhante dissolve semelhante, para a extração de lipídeos solventes não polares como clorofórmio, hexano e metanol são empregados. Pode-se dividir a extração em cinco etapas, como segue (HALIM *et al.*, 2012; BAHADAR E KHAN, 2013):

- i. Exposição da microalga ao solvente, que penetra na membrana celular e entra no citoplasma;
- ii. O solvente interage com lipídeos neutros por forças de Van der Waals;
- iii. Formação do complexo solvente-lipídio;
- iv. Difusão do complexo através da membrana celular;
- v. Difusão do complexo através da filme de solvente estático para fase *bulk* do solvente;

Estas cinco etapas são representadas esquematicamente na FIGURA 4. Preferencialmente o solvente escolhido deve ser volátil de maneira a facilitar o processo de destilação, reduzindo o gasto energético necessário para tal operação unitária.

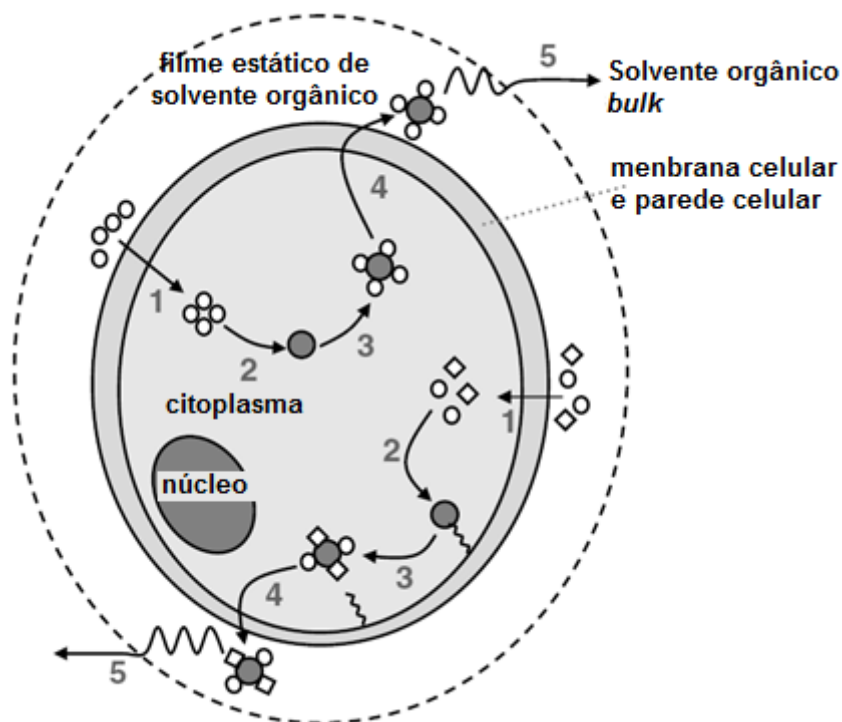


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS, ADAPTADO DE (HALIM *et al.*, 2012)

A escolha do solvente envolve avaliação de rendimento proporcionado por seu uso, seu custo, toxicidade entre outros. Para Demirbas e Demirbas (2011) o solvente orgânico mais popular para extração de lipídios neutros é o hexano, que não possui custo relativamente alto. Já para Bahadar e Kahn (2013) a combinação simultânea de solventes polar/não polar como clorofórmio/metanol podem aumentar o rendimento do processo. Motiva tal explicado pelo fato de alguns lipídeos neutros serem encontrados no citoplasma como um complexo com lipídeos polares, tal complexo está fortemente ligado a proteínas por ligações de hidrogênio, nos quais solventes polares são capazes de romper esta interação (HALIM *et al.*, 2012). Quando utilizada a combinação de solventes com polaridades diferentes é tolerada à matéria prima com certa quantidade de água, ao final do processo a fase lipídica estará presente em solução com o clorofórmio, enquanto proteínas e carboidratos (não lipídeos) em solução com o metanol, porém tal sistema envolve o uso de solvente tóxico, o qual não é desejado.

Álcoois como butanol, isopropanol e etanol podem ser considerados de baixo custo, são voláteis e possuem forte afinidade com o complexo lipídico devido à ligações de hidrogênio, possui como desvantagem sua natureza polar tem limite de

interação com lipídios (HALIM *et al.*, 2011 citado por BAHADAR E KAHN, 2013; ADAM *et al.*, 2012).

Normalmente o processo de extração com solventes orgânicos é realizado em batelada, o que traz como principal desvantagem a limitação da transferência de massa de lipídeos para a fase solvente, devido ao equilíbrio ser alcançado. De maneira a contornar tal dificuldade pode-se empregar a metodologia Soxhlet (BAHADAR E KHAN, 2013).

2.2.1.1 Extração Soxhlet

Extração conduzida de maneira contínua, seu mecanismo consiste da constante evaporação e condensação do solvente, evitando a limitação de transferência de massa e reduzindo o consumo de solvente (BAHADAR E KHAN, 2013; HALIM *et al.*, 2012).

Os equipamentos necessários para a extração, conforme apresentados na FIGURA 5, consistem de um balão de fundo redondo para armazenar solvente, um extrator do tipo Soxhlet contendo biomassa de microalga, condensador e uma manta de aquecimento (BAHADAR E KHAN, 2013). O vapor de solvente alimenta o condensador, que está conectado ao extrator, e promove o contato soluto-solvente condensado até que o volume máximo seja atingido, e o conteúdo solvente-soluto é reciclado ao balão de fundo redondo por efeito de sifonamento, onde novamente o solvente é evaporado renovando o ciclo de extração e o óleo é acumulado (BAHADAR E KHAN, 2013; HALIM *et al.*, 2012).

Segundo Halim *et al.* (2011) este tipo de processo (extração em Soxhlet) apresenta vantagem em relação ao processo de extração com solvente orgânico (no qual não há renovação na iteração de fases extrato/solvente), onde teores para a microalga *Chlorococcum sp.* foram de 0,057 g de lipídeo/g de microalga seca contra 0,015 g de lipídeo/g de microalga seca em processo batelada.

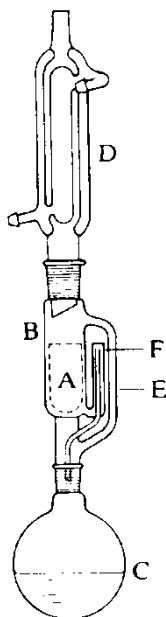


FIGURA 5 - EQUIPAMENTOS PARA EXTRAÇÃO SOXHLET. (A) BIOMASSA DE MICROALGA; (B) EXTRATOR SOXHLET; (C) BALÃO DE FUNDO REDONDO; (D) CONDENSADOR; (E) ALIMENTAÇÃO DE VAPORES DE SOLVENTE; (F) RETORNO DE SOLVETE;

2.2.2 Métodos de ruptura

A eficiência da extração de lipídeos de microalgas é aumentada com o grau de ruptura celular. Quando as células são destruídas, lipídeos são liberados da estrutura celular para o meio externo, de maneira a permitir o contato direto de lipídeo e solvente (soluto e solvente) reduzindo as restrições impostas pela transferência de massa através da membrana celular, e resultando em aumento da velocidade e recuperação de teores de lipídeo (HALIM *et al.*, 2012). Além disto, a quebra celular tem por fim reduzir o consumo de solventes, aumentar a prevenção de contaminação e rendimentos de extração, melhora da qualidade do produto final, redução de tempo de extração, entre outras (NETO *et al.*, 2013).

Para Lee *et al.*, (2012) esta questão tem recebida pouca atenção nos últimos tempos, ou até mesmo sendo ignorada, tratada apenas como etapa de extração.

Os métodos de ruptura celular são classificados em mecânicos ou não mecânicos (física, química e enzimática), representados esquematicamente no diagrama (FIGURA 6). Os mecânicos incluem moinhos de bolas, pressão, homogeneização em alta pressão, ultrasonicassão, autoclave, liofilização e micro-ondas. Enquanto que os não mecânicos envolvem a quebra das células de

microalgas com ácidos, hidróxidos, enzimas ou choques osmóticos (HALIM *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012).

Os diferentes métodos de ruptura celular podem ser aplicados de maneiras individuais ou em várias combinações, entretanto, para a produção de biodiesel existem vários fatores adicionais que coletivamente determinam a sustentabilidade do processo de quebra celular. Tais processos são a dureza da parede celular, economia do processo, facilidade de scale-up, e extensão de contaminantes (LEE *et al.*, 2012).

A aplicação de ultrassom, assim como moinho de bolas e homogeneização a alta-pressão, está entre as metodologias mais utilizadas para microalgas.

Estudo realizado por Lee *et al.*, 2010, HALIM *et al.*, 2012, avaliou o efeito de diferentes metodologias de quebra, utilizando como solvente clorofórmio/metanol (2/1 v/v), e em comparação as células intactas, quando aplicado a quebra o dobro do teor de lipídeos foi obtido.

2.2.3 Extração assistida por ultrassom

A utilização de ultrassom ou sonicadores para a obtenção da porção lipídica de microalgas é encontrada na literatura como método de ruptura (TANG *et al.*, 2011; HALIM *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012; HALIM *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2010; NETO *et al.*, 2013), ou como método de extração, também tratada como extração assistida (ARAÚJO *et al.*, 2013; ADAM *et al.*, 2012).

Extrações em ultrassom (ou extrações assistidas por ultrassom) aumentam a taxa de extração lipídica e em tempo reduzido comparado a outros métodos. Podendo extrair também carotenoides e clorofila. Tem como característica a ruptura da parede celular através das ondas de ultrassom criadas, forçando a remoção dos "constituintes internos para o solvente" (BAHADAR E KHAN, 2013).

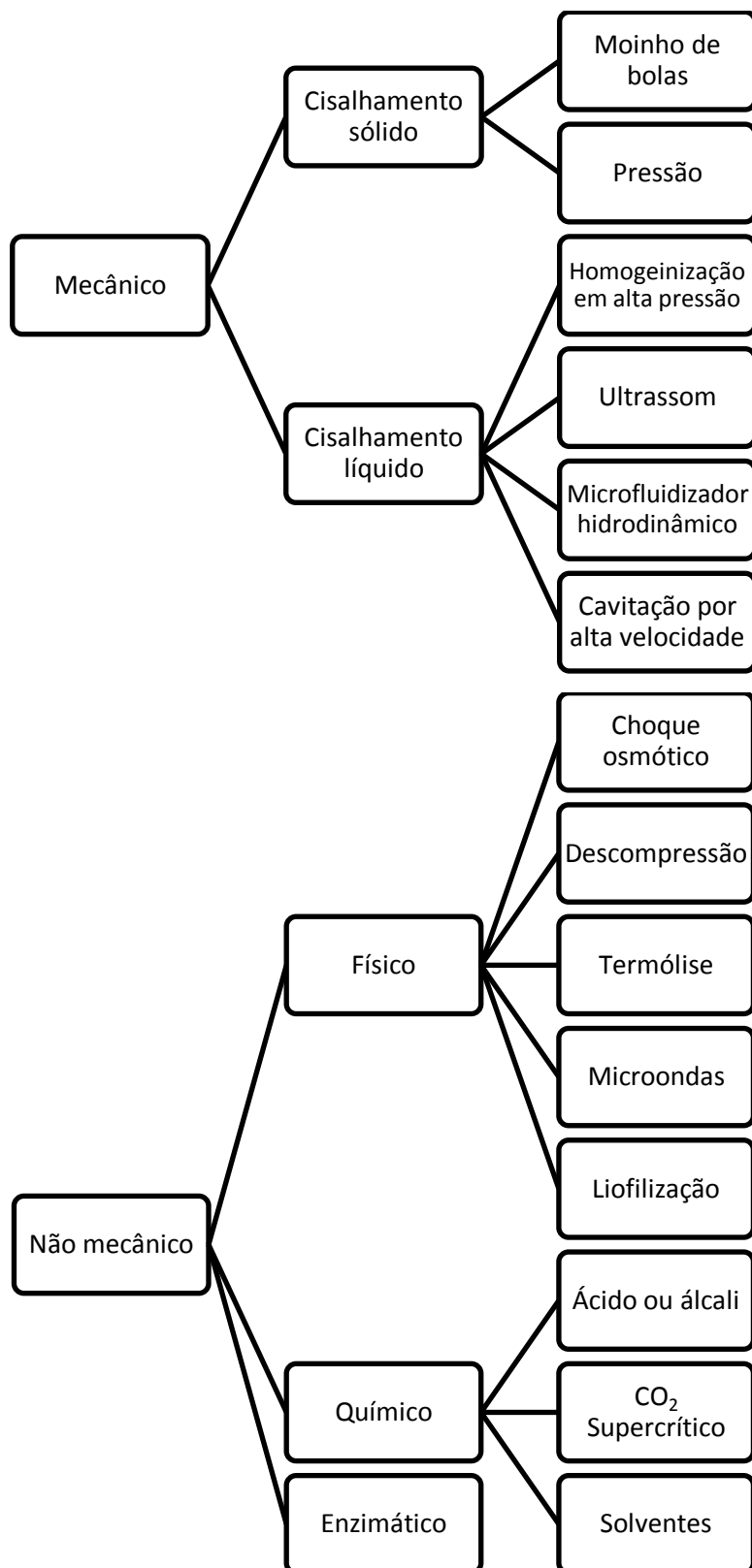


FIGURA 6- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO MECÂNICOS E NÃO-MECÂNICO PARA RUPTURA CELULA. ADAPTADO DE: HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; LEE; LEWIS; ASMAN, 2012.

Capaz de resolver problemas associados com os métodos convencionais, como simplificações de processo de iniciação e manuseio, dando produtos finais de alta pureza, eliminando pós tratamentos de água residual. Isto também pode ser mostrado para ser mais econômico e amigo do meio ambiente: o processo pode também reduzir a quantidade de solvente como também a quantidade de energia necessária comparando com os métodos convencionais, trabalhando a baixas temperaturas ou pela eliminação de solventes caros (ADAM *et al.*, 2012).

Quando ultrassom é aplicado em líquido, existem dois principais mecanismos nos quais células e outras estruturas podem ser alteradas, cavitação e transmissão acústica. Cavitação é a produção de microbolhas devida a aplicação de ultrassom. Como as bolhas continuam a se expandir e contrair, podem eventualmente tornar-se instáveis até implodir violentamente, enviando ondas de choque que rompem materiais ressonantes como as células. Transmissão acústica é o mecanismo que facilita a mistura da solução. Muitos estudos tem mostrado o ultrassom como promessa da quebra de milho para melhora da hidrólise enzimática (BAHADAR *et al.*, 2013; GERDE *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012).

O efeito do ultrassom nos teores de extração é atribuído ao micro fluxo e alta transferência de massa produzida pela cavitação e colapso de bolhas resultando em ruptura celular (ADAM *et al.*, 2012).

Existem basicamente dois tipos de sonicadores, banho (banhos de ultrassom) e de sonda. Ambos usados para processos em batelada mas podem ser adaptados para processos contínuos pela adição de bombas. No intuito de melhorar a eficiência de quebra de materiais resistentes, partículas como areia em baixa granulometria podem ser adicionadas. Entretanto, pelo fato da dissipação rápida de energia em da fonte, existindo um volume máximo para tais reatores, sendo a eficiência função da temperatura e tempo de reação (LEE *et al.*, 2012).

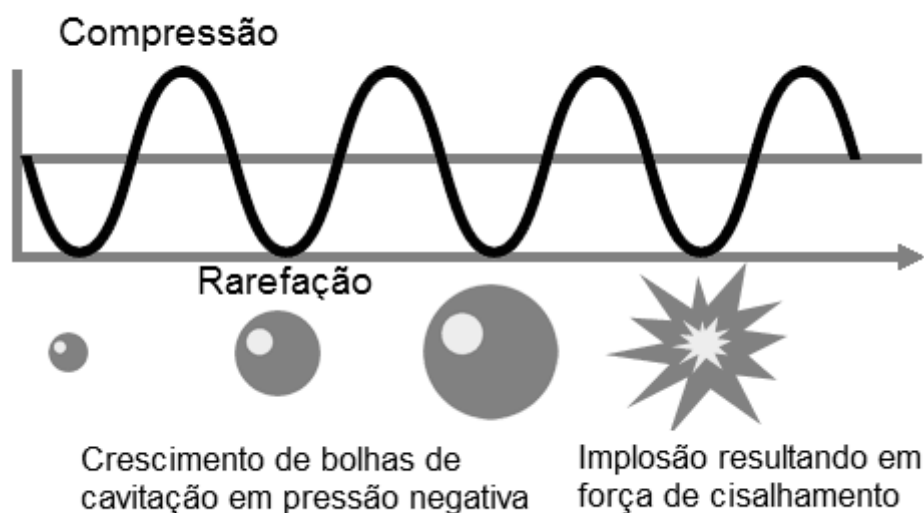


FIGURA 7 - CAVITAÇÃO ACÚSTICA ADAPTADO DE EPIGENTEK, 2014

As sondas de ultrassom usam geradores piezoelétricos feitos de cristais de zirconato de alumínio, que vibram com amplitudes entre 10 μm - 15 μm . As vibrações são então transmitidas abaixo para sonda que aumenta a amplitude para cerca de 100 μm - 150 μm na ponta. Isto é importante para a criação de cavitação com força de destruição suficiente (LEE *et al.*, 2012).

Banhos sonicadores usam transdutores alocados no fundo do reator para gerar ondas ultrassônicas, com o número e arranjo dos transdutores variando de acordo com tamanho e forma do reator. Normalmente possuem capacidades de até 3 L, tendo o limite de capacidade dado pela rápida dissipação da energética com a distância, podendo ser adaptado para processos industriais contínuos (LEE *et al.*, 2012).

Ainda em relação a esta modalidade de processo, é possível aliar um método químico e físico, ou seja, biomassa na presença de solvente orgânico submetido ao tratamento em ultrassom. A exemplo disto Pereira Neto *et al.* (2013) fez uso de extração assistida em ultrassom na presença de hexano, para microalgas das espécies *C. minutissima*, *T. fluviatilis* e *T. pseudonana*, obtendo teores lipídicos de 15,5 %, 40,3 %, 39,5 % respectivamente.

Já Wiyarno *et al.*, (2011), utilizaram a espécie *Nannochloropsis sp.* e etanol como solvente, quando comparado com a metodologia Soxhlet, houve significativa

redução do tempo necessário para extração de 200 min para 51,6 min, e também redução da temperatura requerida.

A aplicação de ultrassom por 10, 20 e 30 min à microalga da espécie *Tetraselmis suecica* resultou em rendimento em teor de lipídeos de 404,40, 410,82 e 420,34 mg de lipídeo por litro de meio de cultura respectivamente. Quando comparado a extração não precedida de pré-tratamento, o resultado obtido foi de 53,51 mg de lipídeo por litro de meio de cultura, ou seja o efeito resultou em obtenção de rendimentos em média 8 vezes maior (HALIM *et al.*, 2013).

Silva (2013) avaliou extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* (aproximadamente 13 g) em banho de ultrassom durante 120 minutos, avaliando o desempenho do método em função de diferentes volumes de etanol, 100 mL e 200 mL, além da mistura etanol/água na proporção 200 mL/ H₂O (4% v:v), obtendo rendimentos em extratos (% m/m) de 14,7; 15,5 e 15,9.

Além das vantagens da metodologia citada, esta permite que altos teores lipídicos possam ser obtidos na presença de etanol, sendo esta solução extrato lipídico/etanol matéria prima para produção de biodiesel, podendo após separação sólido-líquido da mistura resultante do processo de extração, seguir diretamente para etapa de reação, sem a necessidade de evaporação do solvente utilizado.

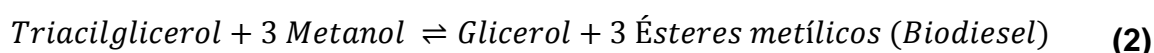
2.3 BIODIESEL DE MICROALGAS

São considerados combustíveis aqueles oriundos de material biológico, como plantas, animais e microrganismos (incluindo microalgas). Podem ser usados direta ou indiretamente como combustível de transporte com pequenas modificações nos motores já existentes, ou combustíveis para várias outras aplicações. Classificados em seu estado físico podem ser sólidos (palha, madeira, serragem e torta de plantas ricas em óleos); líquidos (bioálcool, biodiesel, entre outros); e gasosos, conhecidos como biogás, produto da fermentação anaeróbica de resíduos da agricultura (KIRAN *et al.*, 2014).

Uma segunda classificação normalmente é atribuída a esta modalidade de combustíveis, conforme (KIRAN *et al.*, 2014; RASHID *et al.*, 2014), como segue:

- Primeira geração: Ou biocombustíveis convencionais produzido principalmente por fermentação, esterificação e transesterificação, utilizando oleaginosas voltadas ao consumo alimentar e gorduras animais;
- Segunda geração: Motivado pela utilização de resíduos, como do processamento da indústria de processamento de madeira, casca de frutas, bagaço e palha de cana;
- Terceira geração: Baseada basicamente em microalgas, que contém alto teor mássico de óleo quando comparado a outro microrganismo como bactérias e fungos;

Biodiesel é definido como uma mistura de monoalquil éster produzido pela transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com um álcool na presença de catalisador (ácido ou básico) tendo como subproduto glicerina, conforme representado pela EQUAÇÃO (2) (DEMIRBAS E DEMIRBAS, 2011).



A reação não é limitada ao uso de metanol, apesar de mais utilizado, pode ser realizada na presença de etanol, dois álcoois de curta cadeia. Em comparação as diferentes fontes de matéria para produção de ésteres metílicos/etílicos, as microalgas se destacam dentre as outras espécies, pelo seu poder produtor de lipídio, como mostrado (TABELA 4), (CRUZ *et al.*, 2013).

TABELA 4 - PRODUÇÃO DE ENERGIA E EFICIÊNCIA DE FONTOSSÍNTE DE DIFERENTES BIOMASSAS

Fonte	Combustível produzido	Produtividade (bep ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Eficiência fotossintética (%)
Milho	Etanol	20	0,2
Cana-de-açúcar	Etanol	210-250	2-3
Soja	Biodiesel	13-22	0,1-0,2
Girassol	Biodiesel	8,7-16	0,1-0,2
Microalga	Biodiesel	390-700	4-7

Fonte: Scott *et al.* (2010), citado por CRUZ *et al.*, (2013)

2.4 ASPECTOS ECONÔMICOS

Para Bahadar e Khan (2013), é comprovada a viabilidade técnica da produção de biocombustível de microalgas, porém não economicamente viável. Tal combustível tornaria-se atrativo em um cenário cujo preço do barril de petróleo fosse igual ou superior a \$100.

No presente cenário, biodiesel de microalga não é considerado economicamente viável devido ao custo envolvido. A exemplo do cultivo em fotobioreatores, o capital inicial necessário é cerca de dez vezes superior ao cultivo em tanques abertos, com custo de produção de biomassa estimado entre 30 \$/kg e 70 \$/kg, e o litro do óleo estimado em \$1,40 (para uma microalga com conteúdo lipídico mássico de 30%, onde o máximo valor deveria ser inferior à 0,48 \$/l (DEMIRBAS E DEMIERBAS, 2011; CHISTI, 2007).

Segundo Kleinegris (2011), biomassa de microalga só poderá ser competitiva a combustíveis fósseis se o custo for inferior a 0,50 €/kg, sendo que no atual modelo têm-se o valor aproximado de 4 €/kg, fato tal atribuído ao gasto energético necessário para concentração da biomassa após o cultivo.

Considerando que biodiesel de alga tenha 80% da energia contida no petróleo bruto, o custo estimado do óleo de microalga é estimado conforme Equação (3). (CHISTI, 2007).,

$$C_{\text{óleodealga}} = 6,9 \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{petróleo}} \quad (3)$$

onde:

$C_{\text{óleo de alga}}$, preço do óleo de micro é expresso em \$/L;

$C_{\text{petróleo}}$, preço do petróleo em \$/barril;

Existe a expectativa de que se aumentada a produção anual de biomassa de microalga para 10.000 ton, o seu custo de produção reduziria drasticamente para \$0,47 e \$0,60 para fotobioreatores raceways respectivamente (CHISTI, 2007).

Outra possibilidade para tornar a produção de biodiesel competitiva financeiramente, e o co-processamento do resíduo gerado, cerca de 65% da massa total processada, rico em carboidratos, proteínas, gorduras e outros. Sendo lipídeos convertidos em biodiesel, carboidratos transformados em etanol e proteínas e

demais constituintes residuais em metano, como ilustrado na FIGURA 8 (ZUH *et al.*, 2014).

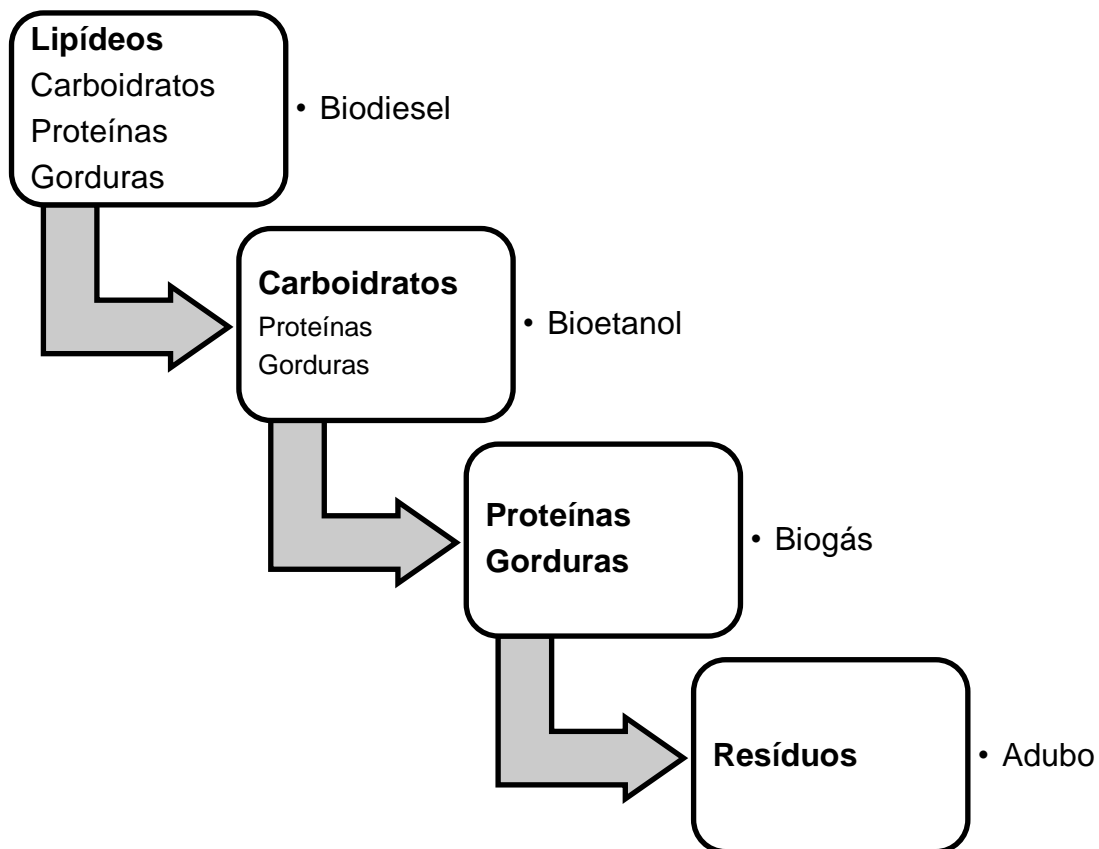


FIGURA 8 - PORPOSTA DE CADEIA PRODUTIVA DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE MICROALGAS. ADPTADO DE ZUH *et al.*, 2014.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do processo proposto de extração assistida em ultrassom estudado, assim como do método de extração por Soxhlet utilizado para comparação de metodologias. Em seguida o modelo cinético para aplicação dos dados obtidos é descrito assim como a metodologia gravimetria e por cromatografia gasosa para determinação do teor de ésteres encontrados em cada amostra avaliada.

3.1 MICROALGA UTILIZADA

A microalga da espécie *Chorella pyrenoidosa* utilizada neste trabalho foi adquirida junto a Florien Insumos Farmacêuticos, em unidades de 1 kg, lote n°: 049277. Optou-se pela utilização desta microalga devido a facilidade compra, a não dependência da sazonalidade de cultivos, manter as mesmas características (mesmo lote) para todos os processos realizados e de mesma granulometria.

3.2 TEOR DE UMIDADE

Cerca de 5 g de cada amostra foram transferidos para pesa-filtro previamente tarado, que foi acondicionado em estufa a 105°C por 2 h. Após este período, pesou-se novamente o conjunto (pesa-filtro e amostra) e pela diferença de massa determinou-se o teor de umidade.

3.3 TEOR DE CINZAS

A mesma quantia utilizada para determinação do teor de umidade foi utilizada para a determinação do teor de cinzas, cerca de 5 g de cada amostra foram transferidos para pesa-filtro previamente tarado, calcinado em chapa de aquecimento e mantido em mufla a 550°C por 4 h. Após este período, as amostras foram acondicionadas em dessecador até resfriar a massa constante, pesou-se novamente o conjunto (pesa-filtro e amostra) e pela diferença de massa determinou-se o teor de cinzas.

3.4 EXTRAÇÃO SOXHLET

Aproximadamente 15 g de amostra de microalga foram transferidas para um pacote feito em papel filtro, e alocados no extrator tipo Soxhlet. Ao extrator foi acoplado um condensador, utilizando água refrigerada a temperatura de 12°C, oriunda de um sistema fechado utilizando banho ultratermostático QUIMIS® Q214S2, e um balão de fundo redondo contendo 200 mL do solvente de interesse, conforme ilustrado na (FIGURA 9).



FIGURA 9 - CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO SOXHLET UTILIZADO.
FONTE: O AUTOR (2014)

A extração foi conduzida por 12 (doze) horas, afim de garantir significativa porção do soluto pelo solvente aplicado. Após extração, a amostra foi rota evaporada, transferida para um tubo de ensaio com tampa, e mantida em estufa a 60°C para termino da remoção de solvente da amostra (extrato). Então pesada para determinação de rendimento mássico do processo, e armazenado sob refrigeração para posterior análise química.

O rendimento da extração foi calculado com a Equação (4), relação mássica da massa de extrato obtido em relação à massa de microalga inicialmente utilizada (base úmida).

$$\text{Rendimento da Extração}(\%) = \frac{\text{Massa de extrato (g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}} \cdot 100 \quad (4)$$

3.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

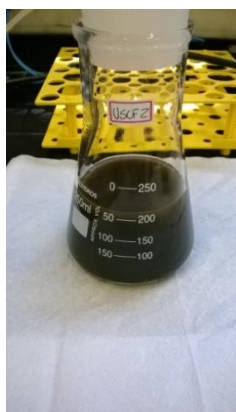
As extrações assistidas por ultrassom foram conduzidas em banho de ultrassom ECO-SONICS Q 59/37^a, com capacidade de 5,7 L, frequência de 37 KHz, potência (máxima) de 165 W, e dimensões da cuba de 27x12x12 cm.

Amostras com massa de 15 g foram colocadas em *Erlenmeyer* de boca larga FIGURA 10(A), juntamente com o solvente de interesse, previamente homogeneizadas FIGURA 10(B), tampados com rolha de silicone, e submetidas a extração pelo tempo de 60 minutos FIGURA 10(C).

Após a extração, as amostras foram filtradas em funil e papel filtro (FIGURA 10-D), e a mistura extrato solvente foi rota-evaporada (FIGURA 10-E), transferida a um tubo de ensaio com tampa, e mantida em estufa sob temperatura de 60 °C para completa evaporação de solvente. Então pesada para determinação de rendimento mássico do processo, e armazenado sob refrigeração para posterior análise química. O cálculo do rendimento mássico da extração por ultrassom foi o mesmo utilizado para o rendimento mássico para extração em Soxhlet (EQUAÇÃO 4).



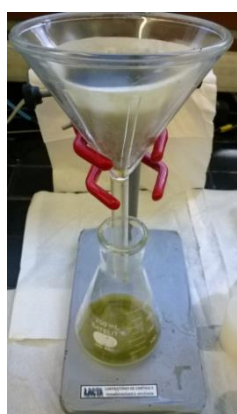
(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

FIGURA 10 - ETAPAS EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRAASOM. PREPARO DA AMOSTRA SECA (A); MISTURA COM SOLVENTE DE INTERESSE (B); EXTRAÇÃO EM ULTRASSOM (C); FILTRAÇÃO (D); CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO (E);

A duração do ensaio foi fixada em 60 minutos devido à limitação física do equipamento utilizado para os experimentos, cuja programação permite como máxima exposição ao efeito de sonificação 1 hora.

O etanol e hexano também foram os solventes utilizados para realização de extrações assistidas em ultrassom. A cuba do banho foi dividida em duas partes iguais e os experimentos foram conduzidos em uma mesma posição para garantir a exposição uniforme às ondas de choque.

Os experimentos foram realizados utilizando um planejamento fatorial 2^3 (dois níveis e três variáveis), com triplicata no ponto central, para avaliar a influência de forma independente e combinada das variáveis: temperatura de extração (Tb), potência do banho (Pb) e razão massa de microalga e volume de solvente (RMV), nos níveis indicados na TABELA 5.

TABELA 5– VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
RMV (mg/mL)	75	100	150
Pb (%)	20	60	100
Tb (°C)	30	45	60

RMV – Razão massa de microalga e volume de solvente; Pb – Potência do banho de ultrassom; Tb – Temperatura do banho de ultrassom.

3.6 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Além das informações em relação a quantidade de extrato obtido, é de interesse conhecer também a cinética do processo, a fim de avaliar o comportamento do processo de extração assistida em ultrassom proposto em função do tempo.

Porém, o levantamento cinético se realizado em condições idênticas às quais foram conduzidas as extrações referentes ao planejamento experimental envolveria o uso de grande quantidade de solvente. Com o intuito de reduzir a demanda de solvente nos experimentos, propôs-se uma redução de escala a 1% em relação à massa de microalga utilizada no planejamento fatorial, ou seja, de 15 g

para 0,1500 g, e do volume de solvente, de 200 mL e 100 mL para 2 mL e 1 mL, respectivamente, mantendo a razão RMV de 150 mg/ml e 75 mg/ml respectivamente como utilizada no planejamento experimental.

Um suporte para tubos de ensaio foi acoplado à bandeja do banho de ultrassom e centralizado na mesma, conforme ilustrado pela FIGURA 11, de maneira a avaliar a possível influência da posição do banho em relação ao teor de extrato obtido.

O tempo de extração foi o mesmo utilizado anteriormente nos planejamentos experimentais (60 min). Depois de decorrido este tempo, foram adicionadas a amostras 3 mL de heptano, sob intensa agitação, para separação da fase lipídica, e adicionada a mesma quantidade de água destilada para a lavagem da fase heptânica. 2 mL da fase superior foram coletados, transferidos para um eppendorf e levados a evaporação total do solvente. O cálculo do rendimento é dado pela razão mássica de extrato obtido por massa inicial de microalga em base úmida.



FIGURA 11 - REDUÇÃO DE ESCALA E AVALIAÇÃO DE MUDANÇA DE POSIÇÃO NA BANDEJA EM RELAÇÃO AO TEOR DE EXTRATO OBTIDO.

Sendo validada a redução de escala, o estudo cinético feito utilizou os mesmos níveis de percentual útil da potencia do banho 20%, 60% e 100%, e adicionado a estes um ensaio sem uso de ultrassom, ou como aqui tratado Pb de 0%. Para este último caso o preparo das amostras e procedimento experimental foi igual aos demais, levados ao banho de ultrassom para manutenção de temperatura, e retirada as devidas alíquotas nos intervalos de tempo.

Para cada condição estabelecida foram avaliados os resultados nos intervalos de 1, 3, 7, 10, 20, 40 e 60 min decorridos do início do experimento. Após a coleta de cada alíquota, o mesmo tratamento dado aos experimentos de validação de redução de escala foi aplicado para a separação da fase lipídica e quantificação via gravimetria do teor de extrato obtido.

3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO

Para modelagem matemática foram utilizados modelos de primeira e segunda ordem para cinética de extração sólido-líquido, dados pela Equação (5) e pela Equação (7) (SEXENA *et al.*, 2011; SAYYAR *et al.*, 2012).

$$\frac{dC_t}{dt} = k_1 \cdot (C_e - C_t) \quad (5)$$

Onde:

C_t – teor de óleo (%) no tempo t ;

C_e – teor de óleo (%) no equilíbrio;

k_1 – constante cinética de primeira ordem (min^{-1});

Tendo como condição inicial, $t = 0$ e $C_t = 0$, a Equação (5), integrada assume a forma da Equação (6).

$$C_t = C_e \cdot (1 - \text{EXP}(-k_1 \cdot t)) \quad (6)$$

$$\frac{dC_t}{dt} = k_2 \cdot (C_e - C_t)^2 \quad (7)$$

Onde:

k_2 – constante cinética de segunda ordem ($\%^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$);

Tomando-se como condição inicial, $t = 0$ e $C_t = 0$, a Equação (5), integrada assume a forma da Equação (8).

$$C_t = \frac{k \cdot C_e^2 \cdot t}{1 + C_e \cdot k \cdot t} \quad (8)$$

Para avaliar a diferença entre os dados preditos pelos dois modelos aos dados experimentais foram calculados os valores de desvio relativo médio absoluto em termos percentuais (AMD%), EQUAÇÃO (9), e desvio quadrático médio (RMSE), pela EQUAÇÃO (10).

$$AMD\% = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{C_{exp} - C_{fit}}{C_{exp}} \right|_i \times 100 \quad (9)$$

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(C_{exp} - C_{fit})^2}{n}} \quad (10)$$

Sendo n o número de dados experimentais disponíveis, e C_{exp} e C_{fit} as concentrações de soluto extraídas experimentalmente e preditas pelo modelo, respectivamente.

A constante cinética de cada modelo assim como a concentração de equilíbrio foram determinadas utilizando a ferramenta *solver* do software Microsoft Excel, de maneira a minimizar o valor de RMSE de cada condição avaliada. O método utilizado foi GRG não linear.

3.8 ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

A síntese dos monoésteres metílicos foi realizada pelo método desenvolvido por Hartman e Lago (1973) e adaptado para microescala por Antoniosi Filho e Lanças (2005). Inicialmente, 200 mg de amostra (microalga *in natura* e extrato obtido) foram transferidos para um tubo de ensaio com tampa rosqueável, junto a 3 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. Em seguida, os tubos foram fechados e levados ao aquecimento a 90°C por 10 min. Após o resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 9 mL da solução esterificante, preparada a partir da mistura de 2 g de cloreto de amônio, 60 mL de metanol e 3 mL de H₂SO₄ concentrado, e os tubos de ensaio permaneceram sob aquecimento a 90°C por 10

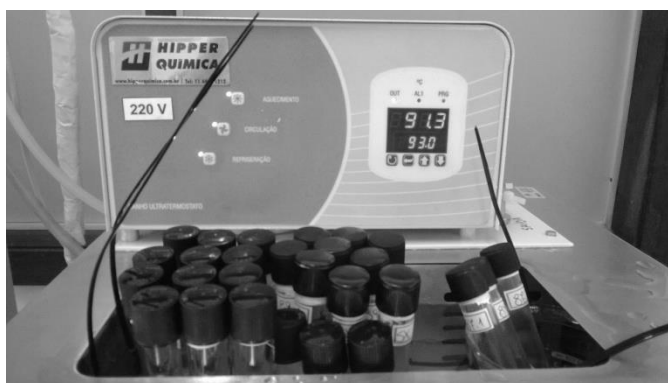
min. Transcorrido este período, deixou-se resfriar até a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 5 mL de n-heptano e 2-10 mL de água deionizada. A mistura foi agitada e a fração heptânica, rica em monoésteres, foi recuperada após separação de fases.

Uma alíquota de 2 mL da fase heptânica foi coletada em *ependorf* e levada a capela para completa evaporação do solvente. A determinação do teor mássico de ésteres obtidos, ou do rendimento de esterificação obtido no processo, foi realizada levando em conta a massa de ésteres obtidos e a massa da amostra submetida ao, conforme Equação (11).

$$\text{Teor de ésteres(\%)} = \frac{\text{Massa de ésteres obtida(g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}} \cdot 100 \quad (11)$$



(A)



(B)



(C)

FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE HARTMAN & LAGO MODIFICADO: PREPARO DE AMOSTRA (A); AQUECIMENTO DURANTE REAÇÃO (B); FINALIZAÇÃO COM COMPLETA SEPARAÇÃO DE FASES (C)

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES VIA CROMATOGRAFIA GASOSA

A determinação da composição de ésteres do extrato de microalga obtido foi utilizando-se cromatografia em fase gasosa (Thermo-Trace 1310) com injetor split/split-less (modo PTV), detector de ionização de chama (FID) e sistema de processamento de dados ChromQuest 5.0. Tanto para a qualificação quanto a quantificação, utilizou-se uma coluna Select Biodiesel para glicerídeos (CP9080) com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm e temperaturas no detector de 420 °C e no injetor e na coluna conforme (TABELA 6). O volume de amostra injetada foi de 1,5 µL e os gases utilizados foram: ar sintético e hidrogênio em razão de 10:1 (v/v) e nitrogênio como gás de arraste (0,8 mL/min) em modo split de 1:10. Para a quantificação foram utilizados os métodos de normalização de área e de padronização externa, quando da disponibilidade de padrões verdadeiros.

TABELA 6 – PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA EMPREGADA NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÉSTERES GRAXOS.

#	Taxa de aquecimento na coluna (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
1	--	90	0
2	4	150	0,5
3	7	190	0,5
4	10	220	0,5
5	40	350	2
6	40	400	2

#	Taxa de aquecimento na injetora (°C/seg)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
1	--	70	0,1
2	5	100	2
3	10	410	28

4 RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho, de maneira a comparar as características da matéria-prima dada pelo teor de umidade e teor de cinzas. Ainda, são apresentados e discutidos os resultados referentes à comparação entre a metodologia Soxhlet, adotada como referência e a proposta de extração assistida por ultrassom com ambos os solventes utilizados (etanol e hexano). São apresentados ainda neste capítulo os resultados da modelagem das cinéticas de extração do óleo de microalgas em sistema assistido por ultrassom e os resultados de ensaios preliminares de clarificação dos extratos obtidos em leito fixo de carvão ativado.

4.1 UMIDADE E CINZAS

A determinação do teor de umidade e cinzas da microalga *C. pyrenoidosa* foi realizado em triplicata. Os valores obtidos para cada ensaio estão apresentados na TABELA 7. O teor médio de umidade e cinzas medidos para a microalga utilizada neste estudo foram de $4,21 \pm 0,04\%$ e $6,63 \pm 0,31\%$, respectivamente.

TABELA 7 – DADOS PARA UMIDADE E CINZAS

Número da repetição	Amostra (g)	Amostra seca (g)	Umidade (%)	Cinzas (%)
1	5,0182	4,8047	4,25	6,49
2	5,001	4,7905	4,21	6,98
3	5,0085	4,7994	4,17	6,41
		Média	4,21	6,63
		Desvio Padrão	0,04	0,31

A determinação de umidade e cinzas mostra-se importante pelo fato da água criar uma barreira polar entre o solvente e o lipídeo, o que pode diminuir a eficiência da transferência de massa. Este fato apresenta um desafio para o uso econômico de solventes apolares para extração de lipídeos de microalgas porque água intracelular

não pode ser removida por processos mecânicos de maneira eficaz (OLMSTEAD *et al.*, 2013).

4.2 EXTRAÇÕES EM SOXHLET

Foram utilizados como solventes o etanol e o hexano. O hexano foi utilizado como padrão para determinação de extraíveis e o etanol devido ao interesse no desenvolvimento de processos acoplados de extração/reacção para a produção de biodiesel de ésteres etílicos. Para ambos os solventes foram feitos ensaios em triplicata para determinação do rendimento de extração em função de cada tipo de solvente utilizado. Estes resultados estão apresentados nas TABELA 8 e TABELA 9.

TABELA 8 – TEOR DE EXTRAÍVEIS EM ETANOL

Número da repetição	Massa de mircoalga (g)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
1	20,0023	1,9605	9,80
2	20,0045	2,5457	12,72
3	20,0172	2,688	13,43
		Média	11,98
		Desvio Padrão	1,92

TABELA 9 - TEOR DE EXTRAÍVEIS EM HEXANO

Número da repetição	Massa de microalga (g)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
1	20,0294	0,3435	1,71
2	20,0081	0,2813	1,40
3	20,0198	0,4459	2,23
		Média	1,78
		Desvio. Padrão	0,41

Os resultados obtidos indicam uma diferença significativa entre os solventes em relação ao rendimento de extração, ou teor de extrato obtido da mesma matéria-prima, em que o etanol apresentou rendimento 6,7 vezes superior ao obtido com hexano. Tal valor serve de indicação para a escolha do melhor solvente a ser utilizado para obtenção de óleo de microalga. A expressiva diferença entre o comportamento chama atenção, uma vez que nos ensaios de rotina laboratorial para

determinação de lipídeos totais hexano é utilizado como padrão. A polaridade e permeabilidade do solvente, e a forma majoritária de como a carga lipídica é encontrada na presente microalga pode justificar a diferença entre os solventes.

4.3 EXTRAÇÕES ASSISTIDAS EM ULTRASSOM

Os onze experimentos realizados para cada um dos solventes conforme planejamento experimental, assim como a ordem aleatória em que foram realizados, são mostrados na TABELA 10. Para distinção entre o solvente utilizado, foram adotados prefixos ao número do experimento: “ET” quando utilizado o etanol, e “HE” quando utilizado o hexano.

TABELA 10 – CONDIÇÕES DE CADA UM DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO, E ORDEM ALEATÓRIA DE REALIZAÇÃO.

Experimento	RMV (mg/mL)	Pb (%)	Tb (°C)	Ordem de realização	
				ET	HE
1	150	20	30	7	4
2	75	20	30	4	2
3	150	100	30	2	8
4	75	100	30	9	11
5	150	20	60	3	5
6	75	20	60	11	9
7	150	100	60	8	3
8	75	100	60	6	7
9	100	60	45	10	10
10	100	60	45	1	6
11	100	60	45	5	1

Na TABELA 11 são apresentados os resultados em termos de rendimento da extração, para ambos solventes.

TABELA 11– RESULTADOS EM TERMOS DE EXTRATO OBTIDO, PARA AS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL, UTILIZANDO ETANOL E HEXANO

Ensaio	RMV (mg/mL)	Pb (%)	Tb (°C)	Rendimento (%)	
				Etanol	Hexano
1	150	20	30	7,16	1,21

Ensaio	RMV (mg/mL)	Pb (%)	Tb (°C)	Rendimento (%)	
				Etanol	Hexano
2	75	20	30	11,35	0,90
3	150	100	30	13,75	1,05
4	75	100	30	14,65	1,16
5	150	20	60	11,05	2,41
6	75	20	60	12,14	0,55
7	150	100	60	13,91	1,62
8	75	100	60	14,27	1,81
9	100	60	45	13,20	1,86
10	100	60	45	11,76	1,00
11	100	60	45	10,96	2,06

A partir dos resultados apresentados na Tabela 11 observa-se que para os dois solventes utilizados obteve-se pelo menos uma condição em que o resultado foi superior ao obtido quando utilizada a metodologia Soxhlet. Estes resultados mostram a eficiência da extração por solvente em sistema assistido por ultrassom.

Os resultados das extrações foram avaliados estatisticamente para o planejamento experimental proposto, utilizando o programa Statistica® 7.0, em um intervalo de confiança de 95%, validados por meio de análise de variância (ANOVA).

Os efeitos das variáveis do processo RMV, Pb e Tb foram avaliados em relação ao rendimento da extração (teor de extrato obtido). Os dados foram submetidos à regressão linear múltipla de maneira a obter o efeito de cada variável independente, combinações binárias e ternárias no processo. Os parâmetros do modelo estatístico (representado pela EQUAÇÃO 10) para ambos solventes são apresentados na TABELA 12. Os resultados da análise de variância são apresentados na TABELA 13.

$$R(\%) = \beta_0 + \beta_1 \cdot RMV + \beta_2 \cdot Pb + \beta_3 \cdot Tb + \beta_4 \cdot RMV \cdot Pb + \beta_5 \cdot RMV \cdot Tb + \beta_6 \cdot Tb \cdot Pb + \beta_7 \cdot RMV \cdot Tb \cdot Pb \quad (12)$$

TABELA 12 – PARÂMETROS DAS EQUAÇÕES DOS MODELOS MATEMÁTICOS

Parâmetros	Símbolo	Etanol	Hexano
Intercepção	β_0	12,20	1,42
RMV (mg/mL)	β_1	-0,82	0,24
Pb (%)	β_2	1,86	0,07
Tb (°C)	β_3	0,56	0,26
RMV.Pb	β_4	0,50	-0,30

RMV.Tb	β_5	0,46	0,18
Pb.Tb	β_6	-0,61	0,05
RMV.Pb.Tv	β_7	-0,32	-0,21

TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS RESPOSTAS AO USO DE ETANOL E HEXANO COMO SOLVENTES

FONTE	SQ	GL	MQ	F	F_{tab}
Solvente Etanol – R ² = 0,9391;					
Regressão	43,01	7	6,14	6,61	6,09
Resíduo	2,79	3	0,93		
Falta de Ajuste	0,21	1	0,21	0,16	18,51
Erro Puro	2,58	2	1,29		
Total	45,80	10	4,58		
Solvente Hexano – R ² = 0,7418					
Regressão	2,41	7	0,34	1,23	6,09
Resíduo	0,84	3	0,28		
Falta de Ajuste	0,21	1	0,21	0,65	18,51
Erro Puro	0,63	2	0,32		
Total	3,25				

SQ = soma dos quadrados; GL = grau de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = distribuição de Fischer encontrada; F_{tab} = distribuição de Fischer tabelada.

A partir da TABELA 13 observa-se que para as respostas avaliadas em termos de rendimento de extrato obtido, os valores de F encontrados para regressão e resíduo são superiores ao respectivo valor tabelado (F_{tab}) quando utilizado etanol como solvente. O que indica que o modelo proposto pelo planejamento fatorial possui validade estatística, ou seja, coerente com os dados experimentais, e que existem tendências quando estes são modelados pela equação empregada. O mesmo não é observado quando empregado hexano, o modelo estatístico não reproduz de maneira satisfatória os dados experimentais.

Os baixos valores de F para falta de ajuste e erro puro, em relação ao respectivo valor de F_{tab}, indicam que os resíduos existentes nos respectivos modelos não são significativos. Para o etanol estes fatores são também corroborados pelo alto valor de R². Portanto, uma vez que os modelos apresentam resultados satisfatórios de ANOVA, seguramente as superfícies de resposta e gráfico de Pareto resultantes desta equação são matematicamente corretas.

Porém como mostrado na FIGURA 13, apenas Pb resulta como variável significativa quando utilizado etanol, ou seja, o aumento da potência favorece o aumento de teor de extrato obtido. Nenhuma interação binária ou terciária foi significativa ao caso estudado, de maneira que a avaliação das superfícies de resposta não apresentam significância prática para avaliação do processo.

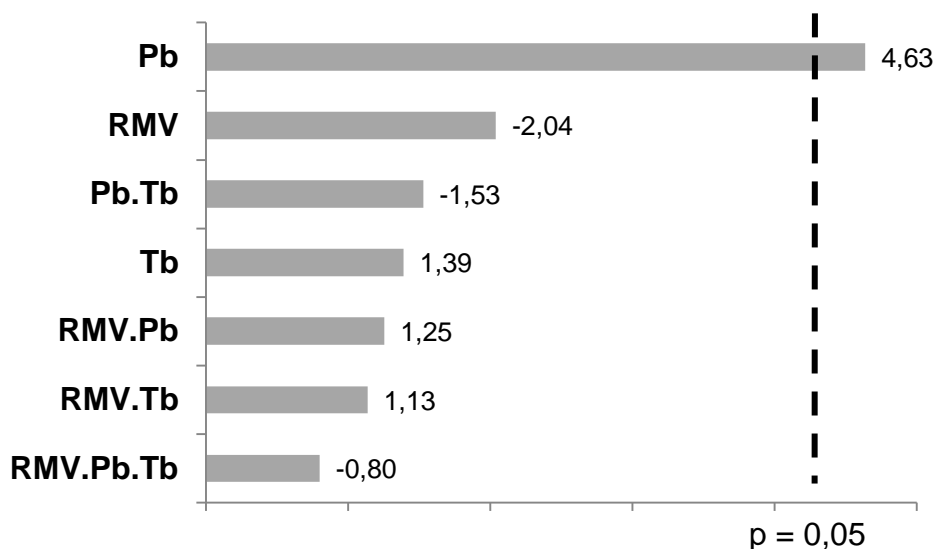


FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO DE EFEITOS PADRONIZADOS PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE PARA VARIÁVEL RENDIMENTO ETANOL (%), COM ERRO PURO = 2,58

Em relação aos resultados de extração usando o hexano como solvente em sistema assistido por ultrassom, a análise de variância com um intervalo de confiança de 95%, conforme apresentado na TABELA 13, resultou em valores de F para regressão e resíduo inferiores ao F_{tab} além de baixo valor de R^2 , o que não permite a validação dos parâmetros para o modelo obtido.

A influência das variáveis para as extrações realizadas com hexano foi avaliada da mesma maneira das realizadas com etanol, utilizando o gráfico de Pareto da FIGURA 31, que mostra a não existência de variável significativa para o solvente avaliado.

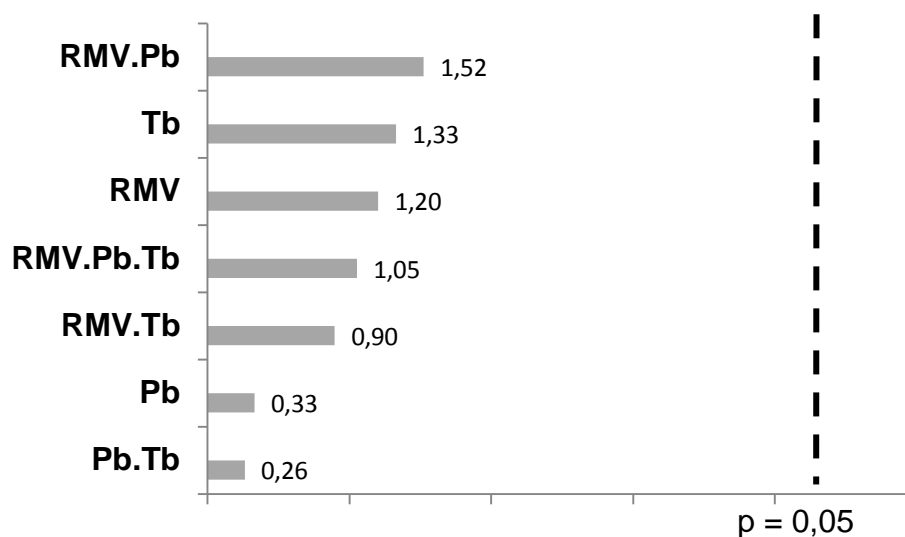


FIGURA 14 - GRÁFICO DE PARETO DE EFEITOS PADRONIZADOS PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ UTILIZANDO HEXANO COMO SOLVENTE PARA VARIÁVEL RENDIMENTO HEXANO (%), COM ERRO PURO = 0,63

Os ensaios no qual o hexano foi empregado como solvente evidenciaram grande diferença de resultados quando comparados aos obtidos com etanol. O melhor resultado obtido para este solvente, condição HE 5 (RMV = 150 mg/mL; Pb = 20%; Tb = 60°C), foi superior ao do processo com extração em *Soxhlet*, com o mesmo solvente. Da mesma maneira, para o etanol a melhor condição ETOH 8 (RMV = 75 mg/mL; Pb = 100%; Tb = 80°C), foi superior ao rendimento obtido em *Soxhlet*. A relação entre os melhores resultados obtidos para cada um dos solventes nas duas técnicas empregadas e a proporcionalidade entre elas é apresentada na TABELA 14.

TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MELHORES CONDIÇÕES OBTIDAS PELAS DUAS METODOLOGIAS TESTADAS, PARA OS SOLVENTES ETANOL E HEXANO

Solvente	Teor de extrato (%)	
	Soxhlet	Ultrassom
Etanol	11,98	14,65
Hexano	1,78	2,41
Razão Etanol/Hexano	6,73	7,65

Após as avaliações estatísticas dos experimentos realizados, as quais indicaram diferença significativa entre os rendimentos obtidos para os diferentes solventes e técnicas avaliadas, optou-se pelas extrações com etanol assistida por ultrassom para continuidade do trabalho, em que os principais fatores para tal decisão foram a redução de tempo de processo e os rendimentos de extração obtidos.

4.4 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO: EXPERIMENTOS E MODELAGEM

Uma vez que temperatura de extração mostrou ser não significativa no processo, esta variável foi fixada em 30°C para a determinação das cinéticas de extração. Ressalta-se que a possibilidade de redução desta variável a níveis próximos à temperatura ambiente tem como vantagem diminuição de consumo energético no processo.

Os valores obtidos para cada uma dos cinco ensaios, para validação da redução de escala de 100% a 1% de RVM, assim como a média e o desvio padrão são mostrados na TABELA 15, e de modo gráfico na FIGURA 15.

TABELA 15 - VALORES OBTIDOS DE TEOR DE EXTRATO PARA EXTRAÇÕES REALIZADAS EM DIFERENTES POSIÇÕES DO BANHO DE ULTRASOM.

Experimento	Massa microalga (g) ^a	Massa de extrato (g)	Rendimento (%)
RE1	0,1553	0,0183	11,78
RE2	0,1557	0,0160	10,31
RE3	0,1546	0,0184	11,93
RE4	0,1566	0,0183	11,68
RE5	0,1581	0,0166	10,53
		Média	11,68
		Desvio Padrão	0,76

^aMassa microalga em base úmida

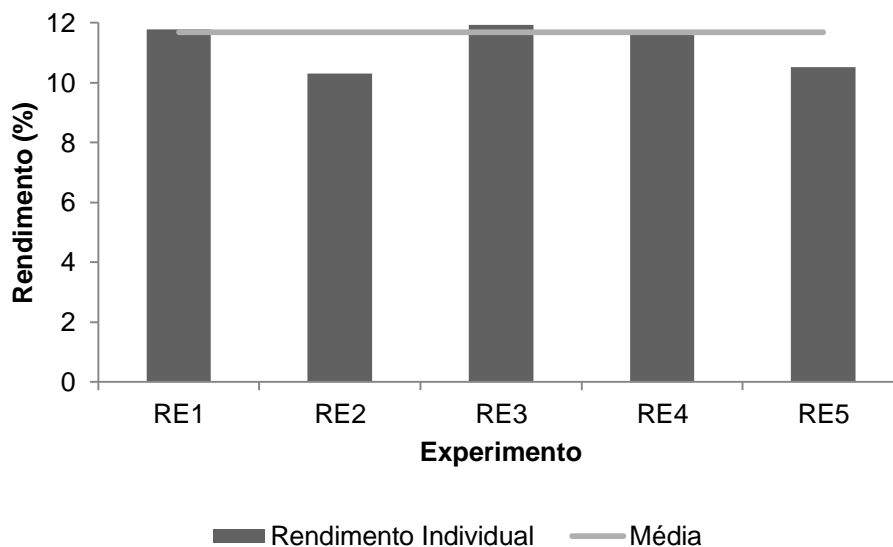


FIGURA 15 - TEOR DE EXTRATO PARA AS REPETIÇÕES TESTADAS E MEDIDAS ENTRE TESTES PARA REDUÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO.

Pode ser observado que os dados obtidos resultaram em uma boa repetitividade do ensaio, assim como a boa representação do processo mesmo em escala reduzida, uma vez que o valor encontra-se dentro do intervalo de confiança de 95% para a condição avaliada. A posição dos tubos no banho de ultrassom não apresentou influência sobre os resultados em rendimento obtido. Este procedimento experimental foi então definido e adotado para o levantamento dos dados cinéticos.

Para as medidas das cinéticas de extração, cada ponto foi feito em triplicata, em que foram utilizados 0,1500 g de microalga, e temperatura fixa de extração de 30 °C. A quantidade de solvente (etanol) foi de 1 mL ou 2 mL de maneira a manter mesma RMV de 150 mg/mL e 75 mg/mL, respectivamente. Os níveis de percentual útil da potencia do banho foram de 0%, 20%, 60% e 100%.

Os teores de extratos médios entre as triplicatas para cada ponto cinético, assim como o desvio padrão médio é apresentados na TABELA 16.

Os modelos de extração de primeira e segunda ordem propostos por SEXENA *et al.*, 2011 e SAYYAR *et al.*, 2012 foram ajustado aos dados. Os valores obtidos para a constante cinética de extração de primeira ordem, k_1 , são apresentados na TABELA 17. Já para o modelo de segunda ordem, os valores de coeficiente angular, coeficiente linear e R^2 oriundos da linearização da curva cinética para aplicação do modelo, e os coeficientes da equação proposta são apresentados na TABELA 18.

TABELA 16 - TEOR DE EXTRATO MÉDIO E DESVIO PADRÃO DO ESTUDO CINÉTICO DE EXTRASSÃO DE MICROALGA ASSISTIDO EM ULTRASSOM

Pb	RMV	Teor de extrato (%)							
		Tempo (min)							
		0	1	3	7	10	20	40	60
0	150	0	2,60	2,69	4,24	6,69	7,08	6,87	7,35
Desvio Padrão		0	0,17	0,56	0,86	0,13	0,17	0,36	0,16
0	75	0	2,82	3,84	4,90	5,25	5,26	6,39	6,51
Desvio Padrão		0	0,29	1,49	0,36	0,73	0,33	0,56	0,30
20	150	0	4,08	4,61	6,20	7,38	8,30	8,31	8,58
Desvio Padrão		0	1,33	0,55	0,70	0,01	0,25	0,43	0,35
20	75	0	3,84	5,50	5,94	5,12	5,77	5,82	6,73
Desvio Padrão		0	0,74	0,82	0,98	0,38	0,17	0,21	0,20
60	150	0	4,87	5,71	6,61	7,46	8,58	9,42	9,72
Desvio Padrão		0	0,35	0,03	0,36	0,65	0,13	0,52	0,17
60	75	0	3,89	5,35	5,60	7,03	6,93	7,14	6,82
Desvio Padrão		0	0,35	0,58	0,26	0,91	0,15	0,18	0,90
100	150	0	4,18	7,27	7,54	9,24	10,51	11,32	11,18
Desvio Padrão		0	0,76	0,42	0,36	0,33	1,06	0,31	1,06
100	75	0	2,48	4,91	5,69	8,09	8,45	8,62	8,98
Desvio Padrão		0	0,17	0,25	0,30	0,55	0,47	0,39	1,11

TABELA 17 – CONSTANTES DE MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM PARA EXTRAÇÕES ASSISTIDAS EM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE.

Variáveis		Ce	k ₁
RMV	Pb		
150	0	7,35	0,17
150	20	8,58	0,26
150	60	9,72	0,25
150	100	11,18	0,26
75	0	6,51	0,27
75	20	6,73	0,71
75	60	6,82	0,66
75	100	8,98	0,21

TABELA 18 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO LINEAR E CONSTANTES DE MODELO CINÉTICO DE SEGUNDA ORDEM PARA EXTRAÇÕES ASSISTIDAS EM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE

Variáveis		Coeficientes		R ²	Ce (% m/m)	E (%.min ⁻¹)	k ₂ (% ⁻¹ .min ⁻¹)
RMV	Pb	Angular	Linear				
150	0	0,1317	0,3600	0,9955	7,59	2,78	0,05
150	20	0,1142	0,1869	0,9990	8,76	5,35	0,07
150	60	0,1007	0,2106	0,9984	9,93	4,75	0,05
150	100	0,0864	0,1605	0,9987	11,57	6,23	0,05

75	0	0,1505	0,3166	0,9975	6,64	3,16	0,07
75	20	0,1527	0,2075	0,9955	6,55	4,82	0,11
75	60	0,1430	0,0760	0,9992	6,99	13,16	0,27
75	100	0,1083	0,2379	0,9983	9,23	4,20	0,05

Na FIGURA 16 são apresentadas as curvas cinéticas experimentais para as diferentes condições experimentais avaliadas. E, nas FIGURAS 17-24 são apresentadas as cinéticas experimentais com os valores obtidos a partir do ajuste dos modelos. A partir dos resultados das cinéticas apresentadas observam-se para ambas as condições a influência da potência do banho no rendimento final do processo, destacando-se os primeiros 10 min de processo, em que ocorre extração da significativa porção de extrato obtido ao final de uma hora de experimento. Para RMV de 150 mg/mL e Pb de 20% e 60%, (FIGURA 16 (A)), apresentam comportamentos muito semelhante, porém quando comparadas a Pb de 100% um significativa diferença causada pela aumento de potência do banho é observado no comportamento cinético. Já para os experimentos com RMV de 75 mg/mL (FIGURA 16 (B)), a aplicação de Pb de 20% e 60% não apresentaram mudança de comportamento significativa a condição realizada sem potência (Pb 0%), Em relação a diferença de RMV, a 150 mg/mL, apresentou melhores resultados em todas as condições em comparação as de condição de RMV de 75 mg/ml

As cinéticas para as condições de RMV igual a 150 mg/mL para as potências de 0%, 20%, 60% e 100% são apresentadas nas FIGURA 17 à 20, respectivamente. Em todas as condições foram observadas altas taxas de extração nos primeiros 10 min de processo. Isso permite identificar duas fases distintas, no qual a primeira é responsável pela obtenção da maior fração de extrato (convectiva), e a segunda apenas uma parcela minoritária possivelmente encontrada nas porções interiores de difícil acesso da célula da microalga em questão (processo difusivo característico). A grande diferença entre os dois modelos cinéticos utilizados estão na fase difusiva, em que o modelo de primeira ordem assume comportamento linear no intervalo de 20 à 60 minutos, e neste mesmo intervalo, o modelo de segunda ordem acompanha a suave variação positiva de teor de extrato.

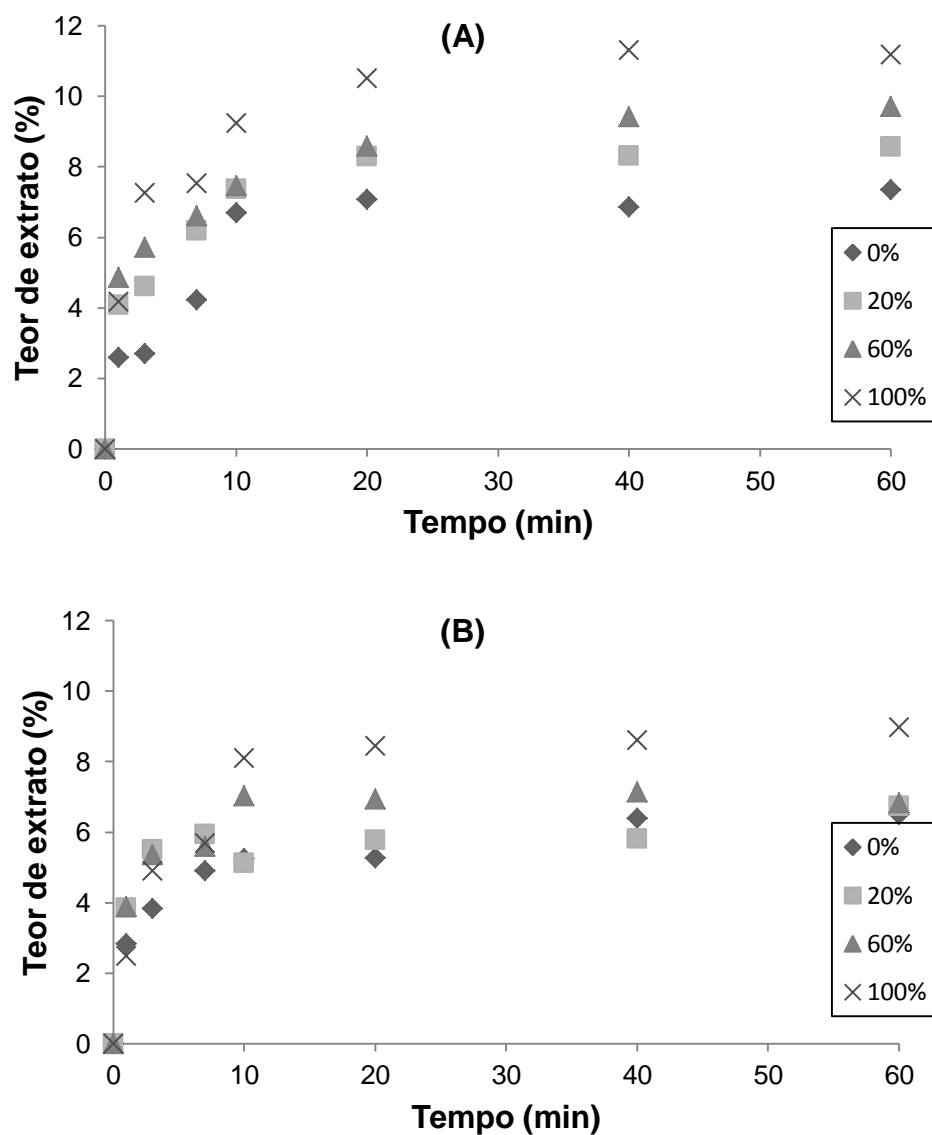


FIGURA 16 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO EM ULTRASSOM EM FUNÇÃO DA POTÊNCIA AVALIADA EM DIFERENTES RMV (ÉTANOL) UTILIZADO, 150 mg/mL (A) E 75 mg/mL (B).

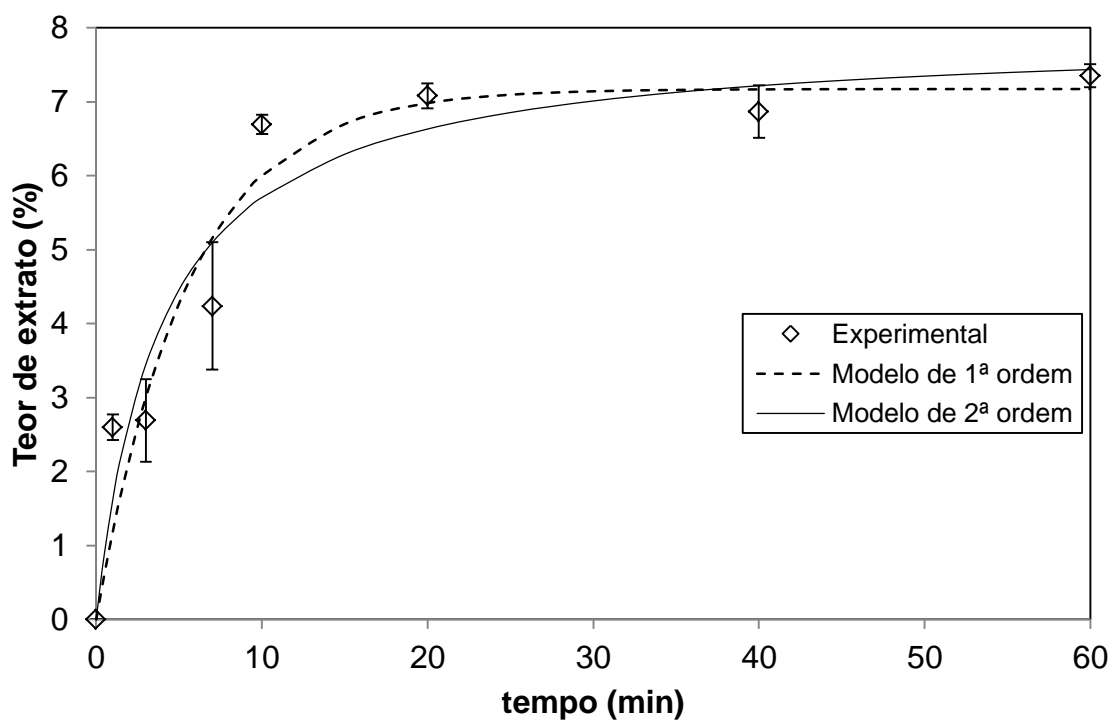


FIGURA 17 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 0%

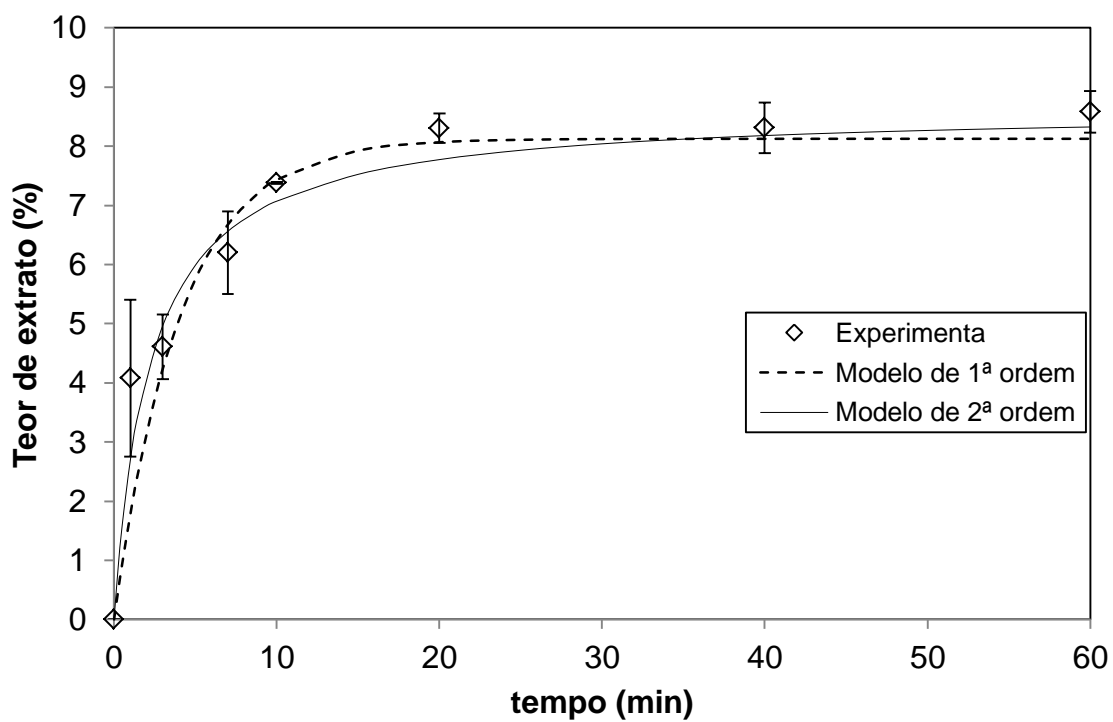


FIGURA 18 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 20%

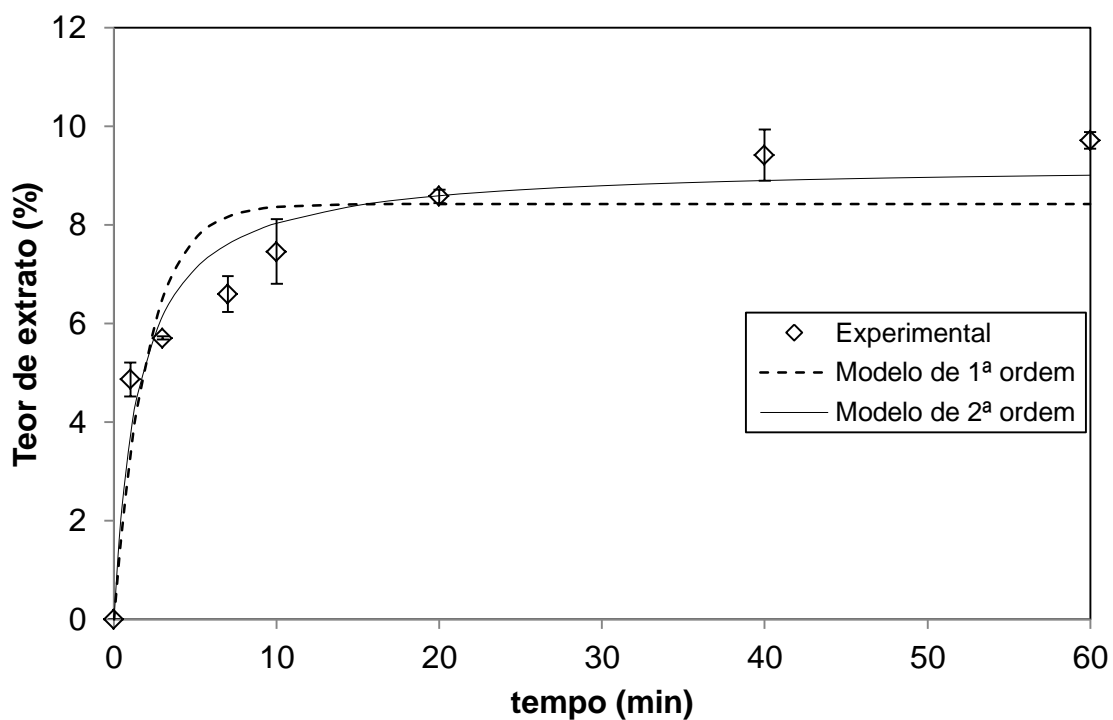


FIGURA 19 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 60%

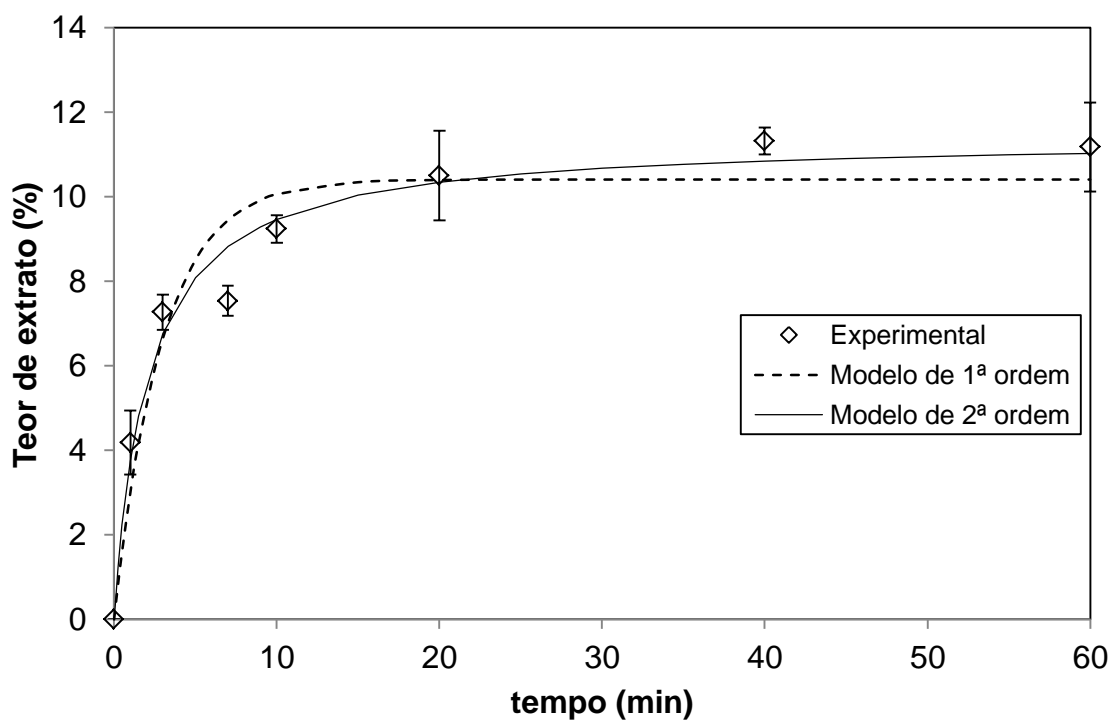


FIGURA 20 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 150 MG/ML E PB = 100%

As curvas cinéticas para as condições de RMV de 75 mg/mL e potências de 0%, 20%, 60 e 100% são apresentadas nas FIGURA 21 à 24. As curvas obtidas apresentam da mesma maneira duas fases distintas de rendimento, sendo a primeira de altas velocidades de extração (fase convectiva) e a segunda com comportamento oposto (a fase difusiva). De maneira geral, quando comparadas à condição de RMV de 150 mg/mL, as curvas cinéticas obtidas na menor concentração apresentaram rendimentos inferiores, e assim como no planejamento experimental a influência de Pb é claramente observado entre as curvas cinéticas. Destaca-se ainda, a cinética obtida para potência de 20% devida inclinação inicial da curva e variação insignificante de rendimento após o ponto experimental medido correspondente à 10 min.

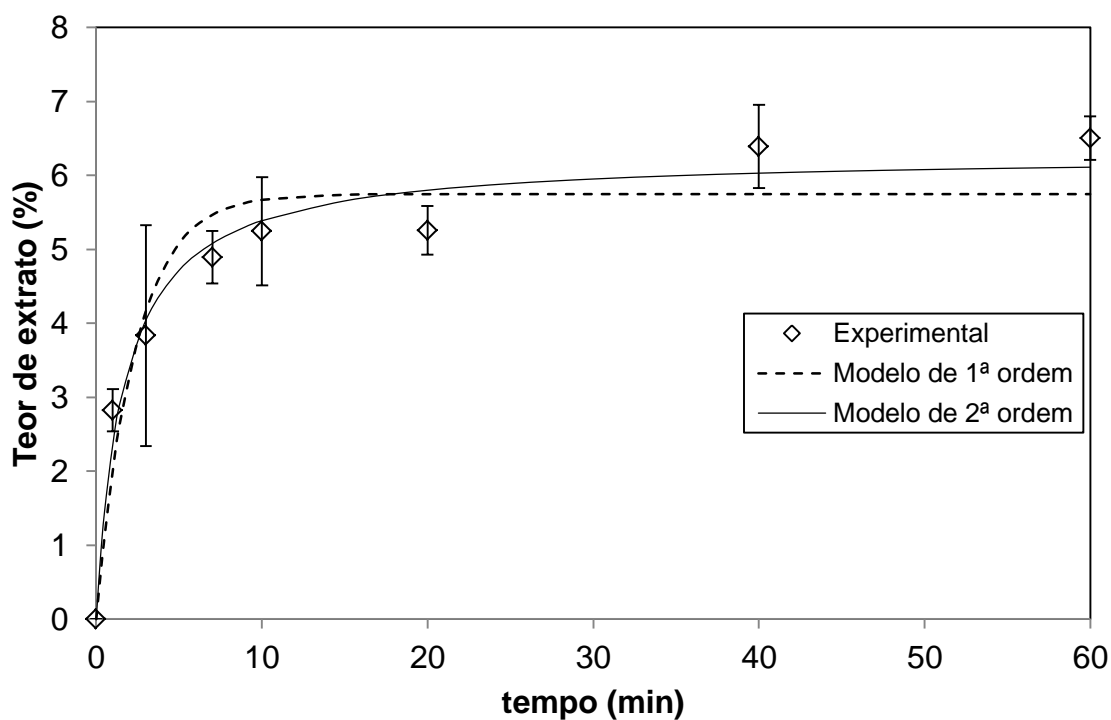


FIGURA 21 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 mg/mL E Pb = 0%

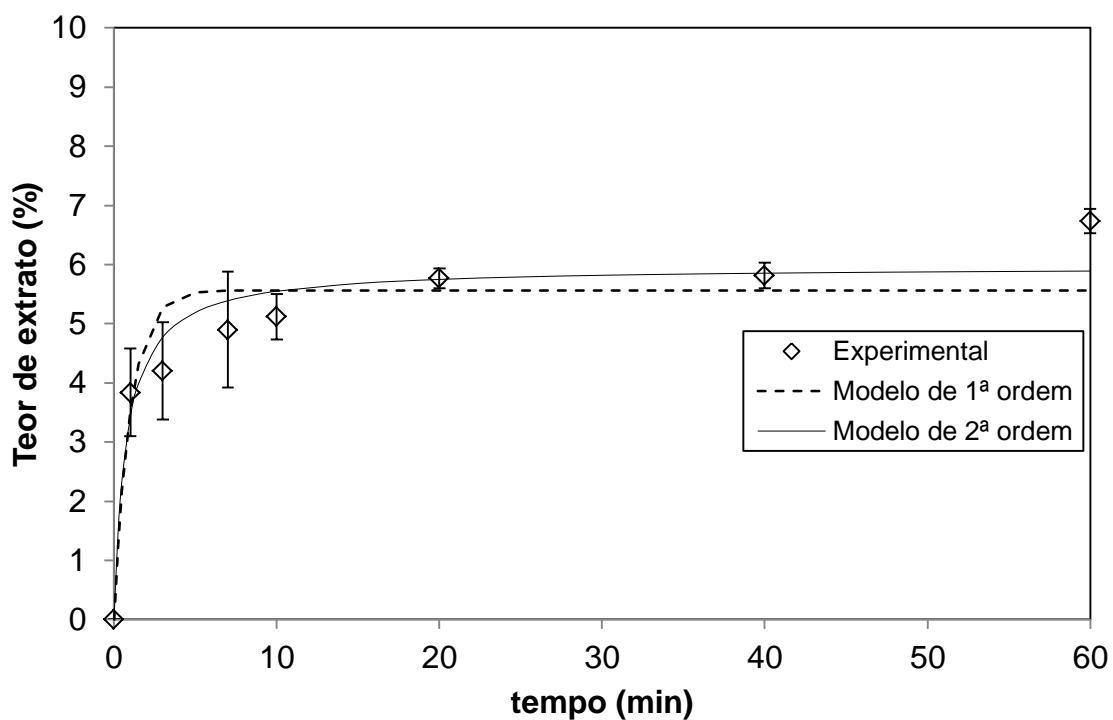


FIGURA 22 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 mg/mL E Pb = 20%

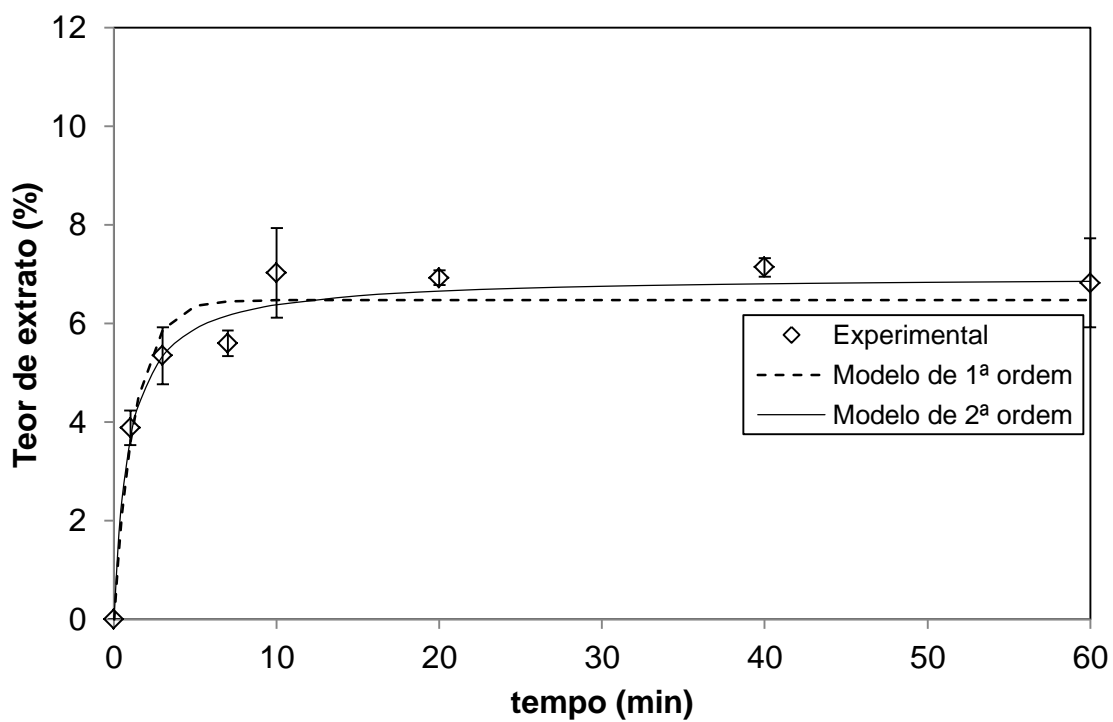


FIGURA 23 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 mg/mL E PB = 60%

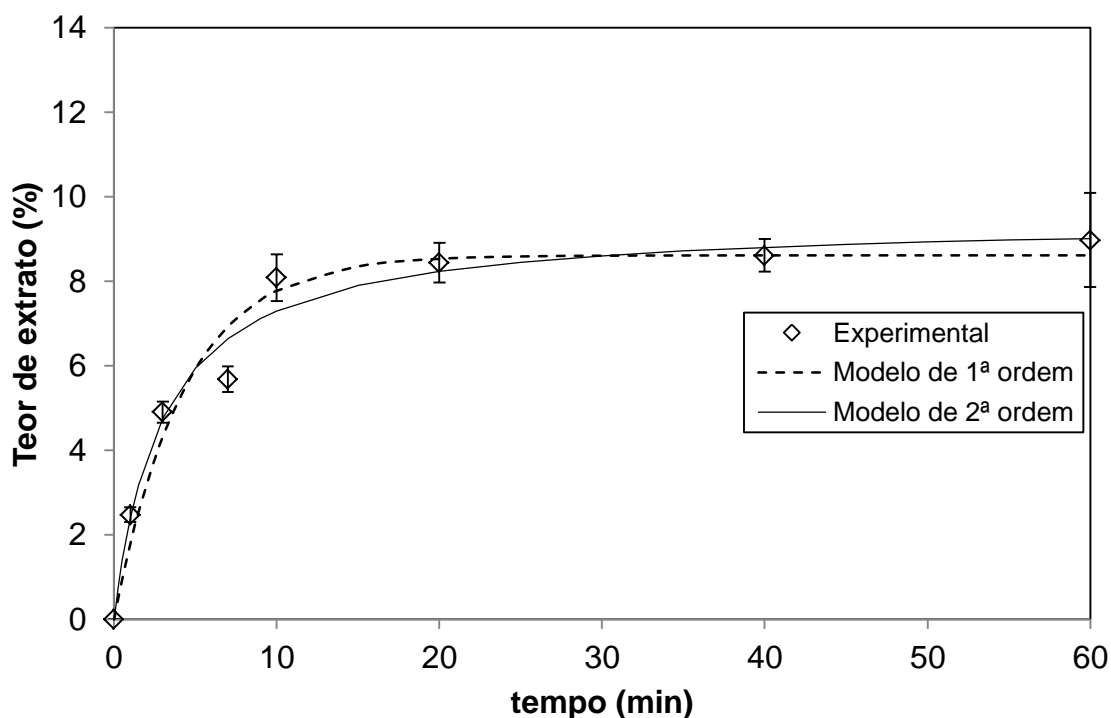


FIGURA 24 - CURVA CINÉTICA EXPERIMENTAL E DO MODELO AJUSTADO PARA RMV = 75 mg/mL E Pb = 100%

Entre os dois modelos avaliados foram observados uma tendência entre seus comportamentos, ambos representam de maneira satisfatória os dados experimentais obtidos, sendo a principal diferença entre os dois na fase convectiva, que compreende os primeiros dez minutos do processo. Se comparado a barra de erros dos dados experimentais e os valores do desvio quadrático médio obtido, conforme TABELA 19, o modelo de segunda ordem melhor descreve os dados experimentais, dado que na quase totalidade das condições avaliadas contempla os erros experimentais e apresenta os menores valores de RMSD quando comparado ao de primeira ordem.

TABELA 19 - VALORES DE DESVIO RELATIVO MÉDIO ABSOLUTO (AMD%) E DO DESVIO QUADRÁTICO MÉDIO (RMSE), PARA OS MODELOS DE EXTRAÇÃO DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM PARA AS CONDIÇÕES DE RMV E PB AVALIADAS

RMV	Pb	1ª ordem		2ª ordem	
		AMD (%)	RMSD	AMD (%)	RMSD
150	0	15,16	0,71	16,21	0,71
150	20	16,30	1,15	13,31	0,89
150	60	15,43	1,14	9,67	0,72
150	100	12,42	1,04	6,27	0,59

RMV	Pb	1ª ordem		2ª ordem	
		AMD (%)	RMSD	AMD (%)	RMSD
75	0	12,60	0,60	7,17	0,36
75	20	10,49	0,64	7,01	0,45
75	60	12,19	0,81	8,04	0,64
75	100	10,04	0,61	5,45	0,49

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTER

Para determinação do teor de ésteres presente nos extratos obtidos em cada uma das condições experimentais avaliadas no planejamento fatorial foram empregadas duas metodologias distintas: por gravimetria e por cromatografia gasosa.

4.5.1 Método gravimétrico

A determinação do teor de ésteres por gravimetria foi realizada utilizando a metodologia de Hartman & Lago modificada (ANTONIOSI FILHO E LANÇAS, 2005), com ensaios em triplicata para os onze pontos do planejamento experimental (2³) realizado para o solvente etanol. Após a realização do procedimento, a fração heptânica (sobrenadante) foi obtida de cada amostra, transferido 1 mL para uma *eppendorf*, e levado a capela sob circulação forçada para total evaporação do solvente seguida de pesagem para determinação da massa de éster presente. A porção restante foi condicionada para cromatografia. As triplicatas são identificadas com índices A, B e C, e assim como os resultados obtidos, as médias e os desvios padrões são apresentados na TABELA 20. Os valores destacados foram descartados pois destoam dos demais ensaios da triplicata.

TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ESTERIFICAÇÃO PARA AMOSTRAS OBTIDAS EM ETANOL.

ENSAIO	Massa de microalga (g)	Massa de éster (g)	Teor de éster (%)	Média	Desvio. Padrão
Et 1 A	0,1060	0,0138	65,09		

ENSAIO	Massa de microalga (g)	Massa de éster (g)	Teor de éster (%)	Média	Desvio. Padrão
Et 1 B	0,1070	0,0141	65,89		
Et 1 C	0,1005	0,0136	67,66	66,21	1,31
Et 2 A	0,1035	0,0131	63,29		
Et 2 B	0,1022	0,0107	52,35		
Et 2 C	0,1088	0,0123	56,53	57,39	5,52
Et 3 A	0,1024	0,0073	35,64		
Et 3 B	0,1032	0,0117	56,69		
Et 3 C	0,1039	0,0106	51,01	53,85	4,01
Et 4 A	0,1002	0,0105	52,40		
Et 4 B	0,1029	0,0125	60,74		
Et 4 C	0,1052	0,0111	52,76	55,30	4,72
Et 5 A	0,1073	0,0124	57,78		
Et 5 B	0,1062	0,0115	54,14		
Et 5 C	0,1089	0,0124	56,93	56,29	1,90
Et 6 A	0,1086	0,0116	53,41		
Et 6 B	0,1092	0,0134	61,36		
Et 6 C	0,1014	0,0112	55,23	56,66	4,16
Et 7 A	0,0994	0,0129	64,89		
Et 7 B	0,1033	0,0133	64,38		
Et 7 C	0,1050	0,0118	56,19	61,82	4,88
Et 8 A	0,1006	0,0118	58,65		
Et 8 B	0,1019	0,0119	58,39		
Et 8 C	0,1002	0,0116	57,88	58,31	0,39
Et 9 A	0,1093	0,0130	59,47		
Et 9 B	0,1008	0,0129	63,99		
Et 9 C	0,1084	0,0130	59,96	61,14	2,48
Et 10 A	0,0999	0,0164	82,08		
Et 10 B	0,1014	0,0117	57,69		
Et 10 C	0,1016	0,0134	65,94	61,82	5,84
Et 11 A	0,1000	0,0106	53,00		

ENSAIO	Massa de microalga (g)	Massa de éster (g)	Teor de éster (%)	Média	Desvio. Padrão
Et 11 B	0,1032	0,0092	44,57		
Et 11 C	0,1072	0,0090	41,98	46,52	5,76

Os extratos submetidos ao ensaio de Hartman & Lago modificado com maior conversão a éster foi o da condição ET 1, o qual destaca-se por utilizar os níveis mínimos das variáveis avaliadas do planejamento experimental, ou seja, a menor quantidade de solvente e menor dispêndio energético, seguido pelas condições ET 7 e ET 10, nas quais resultou no mesmo valor numérico de material graxo convertido, sendo a condição ET 10 ponto central do planejamento fatorial, ou seja, uma menor carga de energia foi necessária para sua obtenção, pois foi realizado em menores valores de Pb e Tb, quando comparados entre si.

Porém, para avaliação do processo proposto no presente trabalho visando alimentar a etapa de conversão do óleo de microalga a biodiesel, o rendimento de extração e de esterificação apresentados na TABELA 11 e TABELA 20, foram confrontados, e calculados o rendimento total do processo, ou seja, qual a porcentagem foi obtida em éster a partir da massa inicial de microalgas avaliada, como exibido na TABELA 21 e FIGURA 25.

TABELA 21 - COMPARAÇÃO ENTRE RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO E TEOR DE ÉSTER, E O CÁLCULO DO RENDIMENTO DO PROCESSO

Ensaio	RMV (mg/mL)	Pb (%)	Tb (°C)	Rendimento de extração (%)	Teor de éster (%)	Rendimento do processo (%)
1	150	20	30	7,16	66,21	4,74
2	75	20	30	11,35	57,39	6,51
3	150	100	30	13,75	53,85	7,40
4	75	100	30	14,65	55,30	8,10
5	150	20	60	11,05	56,29	6,22
6	75	20	60	12,14	56,66	6,88
7	150	100	60	13,91	61,82	8,60
8	75	100	60	14,27	58,31	8,32
9	100	60	45	13,20	61,14	8,07
10	100	60	45	11,76	61,82	7,27

Ensaio	RMV (mg/mL)	Pb (%)	Tb (°C)	Rendimento de extração (%)	Teor de éster (%)	Rendimento do processo (%)
11	100	60	45	10,96	46,52	5,10

Quando avaliado o rendimento do processo os três melhores rendimentos obtidos foram para as condições ET 7, ET 8 ET 4, nesta ordem, as quais foram realizadas com a mesma Pb, o que confirma a avaliação prévia da influência significativa desta variável ao processo. Diferenciando-se Tb e RMV entre experimentos de melhor resultados, a variação entre os ensaios ET 7 e ET 4 são pequenas, ou seja, ET 4 representa 94,2% do rendimento obtido na condição ET 7, o que leva a conclusão que a determinação das condições de extração será tomadas em relação a economia de solvente e com a geração e/ou consumo de energia para manutenção da temperatura da solução durante o processo de sonificação realizada em máxima potência. A comparação gráfica destes resultados é apresentada na FIGURA 26.

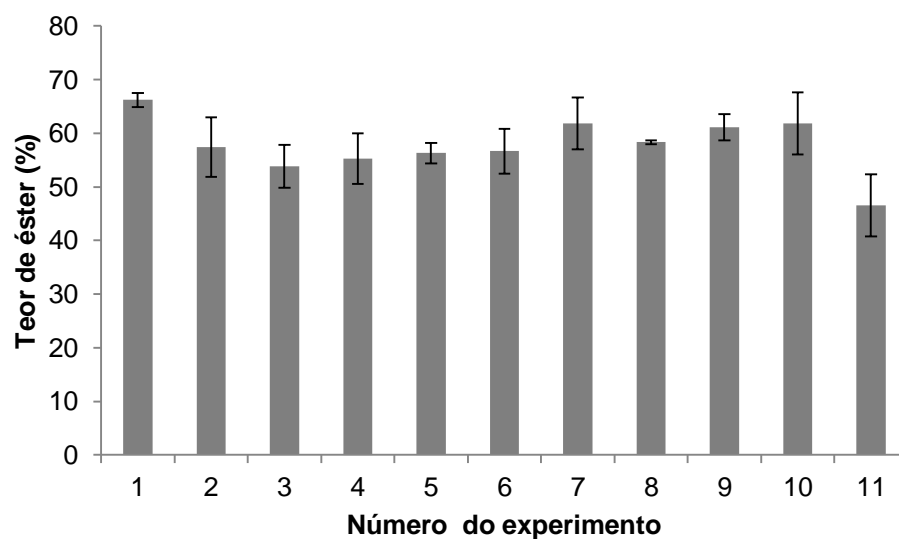


FIGURA 25 - TEOR DE ÉSTER DOS EXTRATOS EM ETANOL OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRASSOM VIA GRAVIMETRIA.

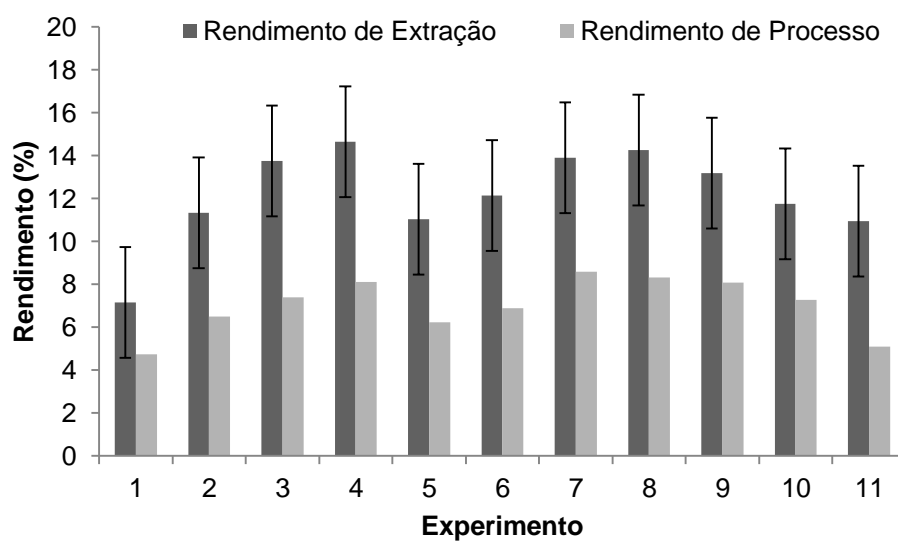


FIGURA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E DO PROCESSO OBTIDO PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA COM ULTRASSOM UTILIZANDO ÉTANOL COMO SOLVENTE QUANTIFICADO POR GRAVIMETRIA

4.5.2 Método cromatográfico

Assim como uma porção da fase sobrenadante resultante do ensaio de Hartman & Lago foi separada para secagem e determinação gravimétrica, uma

alíquota de 1 mL foi transferida para um vial e submetida a avaliação por cromatografia gasosa. Tal método permite além da quantificação de ésteres, uma possibilidade de medição em linha de processo quando em escala industrial. Para quantificação, foi utilizado padronização externa, ou seja, a amostra foi impregnada com massa conhecida de éster metílico C19:0, cujo área do pico relacionado após integração da curva cromatográfica é relacionada com sua massa, sendo tomada como base para os demais ésteres.

A identificação dos demais ésteres foi feita a partir de injeção de padrões cromatográfico de ésteres metílicos, utilizando como referência seus tempos de retenção. A quantificação foi feita utilizando a EQUAÇÃO (13) (DUVEKOT, 2011).

$$\text{Teor de éster (\%)} = \left(\frac{\Sigma \text{Área de ésteres} - \text{Área C19:0}}{\text{Área C19:0}} \cdot \frac{C_{EJ} \cdot V_{EJ}}{m} \right) \cdot 100 \quad (13)$$

C_{EJ} = Concentração em mg/mL, da solução de C19:0; V_{EJ} = volume da solução de C19:0 em mL; m = massa da amostra em mg.

Os resultados obtidos referentes à quantificação de cada triplicata, assim como as médias e desvios padrões são apresentados na TABELA 22 e FIGURA 27. Foi observado como melhor rendimento obtido a condição ET 1 seguida pela condição ET 8, com condições de extração para cada uma delas completamente diferentes. No ponto de vista apenas do processo de conversão a preferência seria dada a primeira condição pela menor demanda energética necessária para potência e temperatura do banho.

TABELA 22 - QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS VIA CROMATOGRAFIA GASOSA E UTILIZAÇÃO DE PADRONIZAÇÃO INTERNA.

		A	B	C	Média %	Desvio Padrão %
Et	1	68,75	73,29	83,80	73,29	7,72
Et	2	62,80	63,69	77,41	63,69	8,19
Et	3	62,06	62,13	63,18	62,13	0,63
Et	4	60,92	61,18	60,20	60,92	0,51
Et	5	68,00	63,89	80,40	68,00	8,60

Et	6	65,80	67,40	71,19	67,40	2,77
Et	7	65,70	63,76	64,98	64,98	0,98
Et	8	70,19	74,23	68,55	70,19	2,92
Et	9	62,33	65,95	67,07	65,95	2,48
Et	10	70,16	67,18	66,38	67,18	1,99
Et	11	60,86	50,71	59,96	59,96	5,62

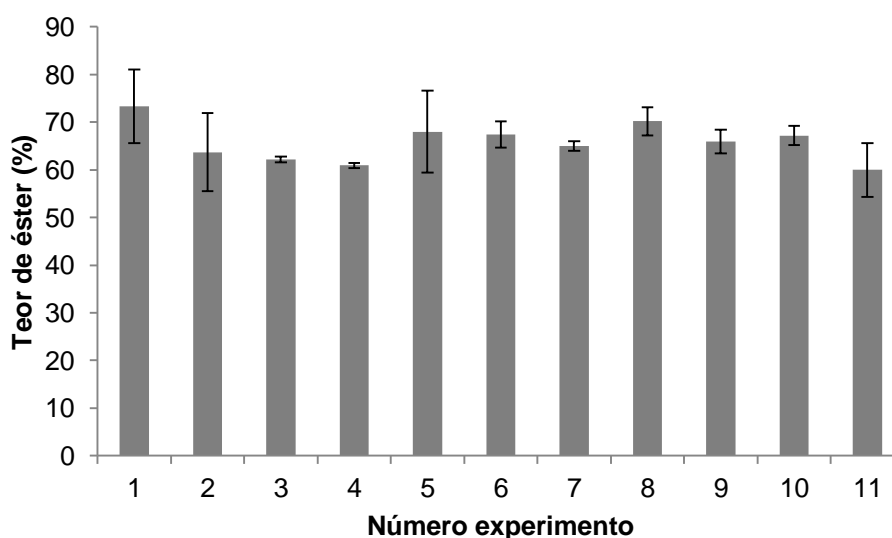


FIGURA 27 - TEOR DE ÉSTER DOS EXTRATOS EM ETANOL OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA EM ULTRASSOM VIA CROMATOGRAFIA GASOSA.

Porém, para a avaliação e escolha da melhor condição, assim como para o método gravimétrico, foi calculado o rendimento do processo proposto, e os resultados são mostrados na forma de dados na TABELA 23 e FIGURA 28. Destacaram-se os ensaios ET 8 e ET 7 nesta ordem, tendo como única diferença entre as variáveis de processo a RMV, que pode apresentar vantagens para etapas subsequentes em qual o presente trabalho se encontra inserido, já que o processo de produção de biodiesel é por transesterificação na presença de etanol, ou seja se menores valores de RMV garantem excesso de etanol em relação a massa de extrato. Apenas levando em consideração o custo de solvente, quanto maior o valor de RMV, menor seu consumo resultando em economia. Os dados obtidos por esta metodologia confirmam, assim como as demais avaliações, a influência de Pb no resultado.

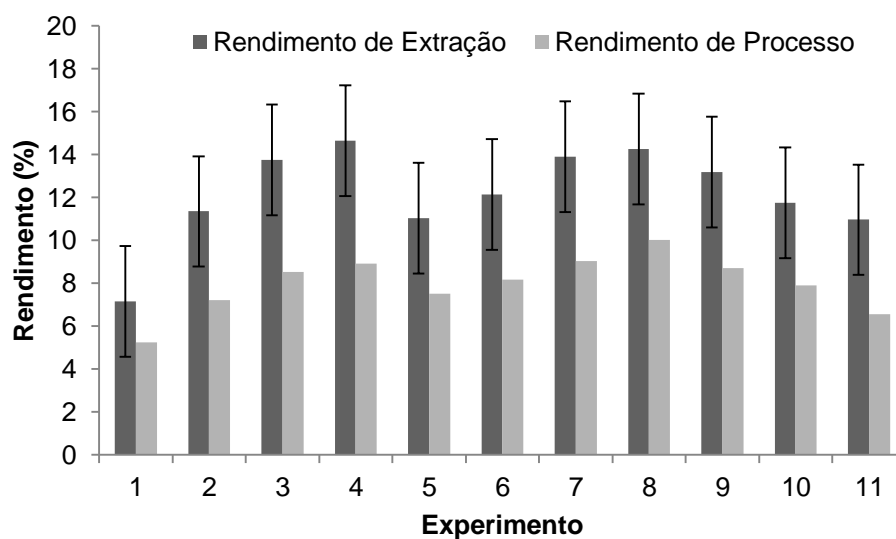


FIGURA 28 - COMPARAÇÃO ENTRE RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E DO PROCESSO OBTIDO PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA COM ULTRASSOM UTILIZANDO ETANÓL COMO SOLVENTE QUANTIFICADO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

TABELA 23 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES EM RELAÇÃO AO EXTRATO OBTIDO EM DIVERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DO PROCESSO EM RELAÇÃO A MASSA INICIAL DE MICROALGA UTILIZADA.

Condição	% Extrato	% Éster	Rendimento Processo (%)
ET1	7,16	73,29	5,25
ET2	11,35	63,69	7,23
ET3	13,75	62,13	8,54
ET4	14,65	60,92	8,93
ET5	11,05	68,00	7,51
ET6	12,14	67,40	8,18
ET7	13,91	64,98	9,04
ET8	14,27	70,19	10,01
ET9	13,20	65,95	8,71
ET10	11,76	67,18	7,90
ET11	10,96	59,96	6,57

O perfil cromatográfico de todas as amostras avaliadas seguiu um padrão, conforme apresentado na FIGURA 45, a variação observado entre as diferentes

amostras foi em relação às áreas de picos, o que diferenciou o resultado entre cada corrida cromatográfica. .

De maneira geral os dois métodos testados e apresentados indicam a mesma tendência em relação aos resultados tanto no teor de ésteres obtidos, sendo o experimento de condição ET 1 com melhor resultado em termos de esterificação, e na avaliação do rendimento do processo como um total (extração de óleo e obtenção de éster), cuja condição ET 8 destacou-se como melhor resultado. Ambos necessitam da etapa prévia de esterificação, ensaio de Hartman & Lago (ANTONIOSI FILHO, LANÇAS; 2005), sendo o método gravimétrico mais barato e lento, devido ao tempo necessário para secagem da amostra, e o cromatográfico oneroso e rápido, já que a amostra é preparada a partir da fase sobrenadante do produto da reação de esterificação.

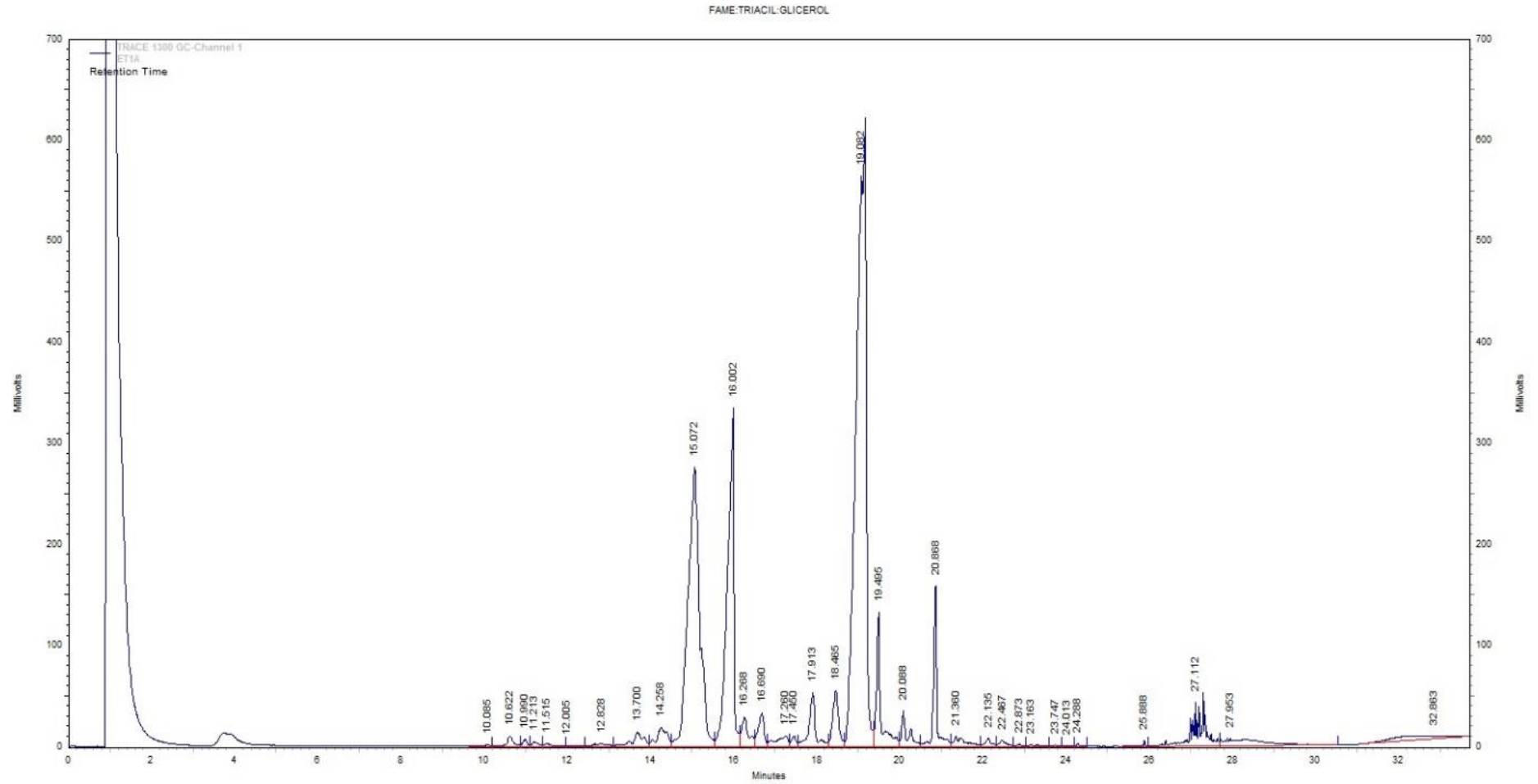


FIGURA 29 - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA PARA AVALIAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DA AMOSTRA ET 1 A .

4.6 PURIFICAÇÃO DE EXTRATO - REMOÇÃO DE CLOROFILA

Durante a realização dos ensaios de extração um fato que chamou atenção foi a coloração esverdeada dos mesmos devido a presença de clorofila. Desta forma, no presente trabalho foram realizados alguns ensaios de clarificação do óleo de microalga extraído em sistema assistido por ultrassom por meio de adsorção em coluna de leito fixo usando carvão ativado.

A unidade experimental utilizada consistiu de uma coluna de 245 mm de comprimento, 14 mm de diâmetro nominal e 7 mm de diâmetro interno, uma bomba de HPLC (SHIMADZU LC-20AT), um transdutor e indicador de pressão e uma válvula agulha para controle do fluxo da solução a ser tratada, conforme mostrado na Figura 30. Foram utilizados 350 mg de carvão ativado sem nenhum tratamento prévio.

A determinação da quantidade de clorofila foi realizada com base na leitura do valor de absorvância da solução alcoólica tratada, conforme apresentado nos trabalhos de Macías-Sánchez *et. al* (2004) e Sabah (2007). Porém, ao invés de utilizar diretamente uma correlação matemática partindo dos valores de absorvância em determinado comprimento de onda foi verificado se tais comprimentos correspondiam a picos de respostas nos devidos espectros de varredura no intervalo de 400 – 900 nm na faixa visível (UV-vis). De maneira a ter como valor máximo ou referência a resposta para a solução após o processo de extração.

O sistema proposto foi testado utilizando extrato lipídico de *Chlorella pyrenoidosa* em solução de etanol previamente filtrada em funil com papel filtro, resultante do processo assistido por ultrassom utilizando RMV de 75 mg/mL, Pb de 100% e Tb de 30 °C. A solução foi então bombeada com vazão de 3 mL/min, com pressão variando de 4 à 7 bar. Foram tomadas alíquotas em intervalos regulares de tempo (5 min), até que fosse observada a saturação do adsorvente por diferença de coloração no eluente, alteração esta observada nas leituras de absorvância. Parte de cada alíquota foi transferida a um *ependorf* e levado a secagem para observação da coloração final do extrato (FIGURA 31), e outra porção utilizada para leitura de absorvância. Os dados coletados são mostrados na TABELA 24A contagem de tempo foi dada a partir da primeira gota eluída no sistema.

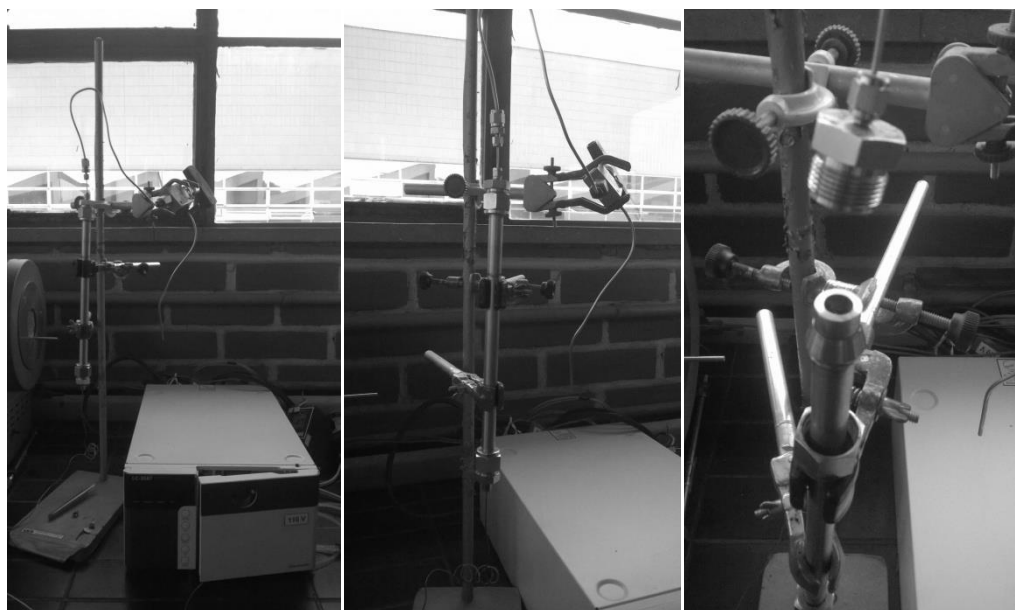


FIGURA 30 - APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA TESTE DE CLARIFICAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGA EM LEITO FIXO UTILIZANDO CARVÃO ATIVADO COMO ADSORVENTE

TABELA 24 - LEITURAS DE ABSORBÂNCIA EM COMPRIMENTOS DE ONDA DE 412 NM E 664 NM DAS ALÍQUOTAS DA SOLUÇÃO DE EXTRATO SUBMETIDA AO PROCESSO DE CLAREAMENTO POR ADSORÇÃO

Amostras	tempo (min)	Volume amostra (mL)	Volume etanol (mL)	Absorbância		Absorbância / massa extrato	
				412	664	412	664
1	5	3	0	0,055	0,007	1,67	0,21
2	10	3	0	0,008	0,000	0,24	0,00
3	15	3	0	0,003	0,002	0,09	0,06
4	20	3	0	0,001	0,000	0,03	0,00
5	25	3	0	0,111	0,000	3,36	0,00
6	30	3	0	0,298	0,001	9,03	0,03
7	35	3	0	0,551	0,003	16,69	0,09
8	40	3	0	0,893	0,005	27,05	0,15
9	45	1,5	1,5	0,740	0,008	44,83	0,48
10	50	1,5	1,5	1,180	0,009	71,49	0,55
11	55	0,5	2,5	0,896	0,010	162,86	1,82
12	60	0,03	3	0,171	0,013	518,02	39,38
13	65	0,03	3	0,202	0,007	611,93	21,21
14	100	0,03	3	0,315	0,010	954,24	30,29
15	105	0,03	3	0,355	0,005	1075,42	15,15
16	110	0,03	3	0,399	0,009	1208,71	27,26
17	115	0,03	3	0,403	0,031	1220,82	93,91

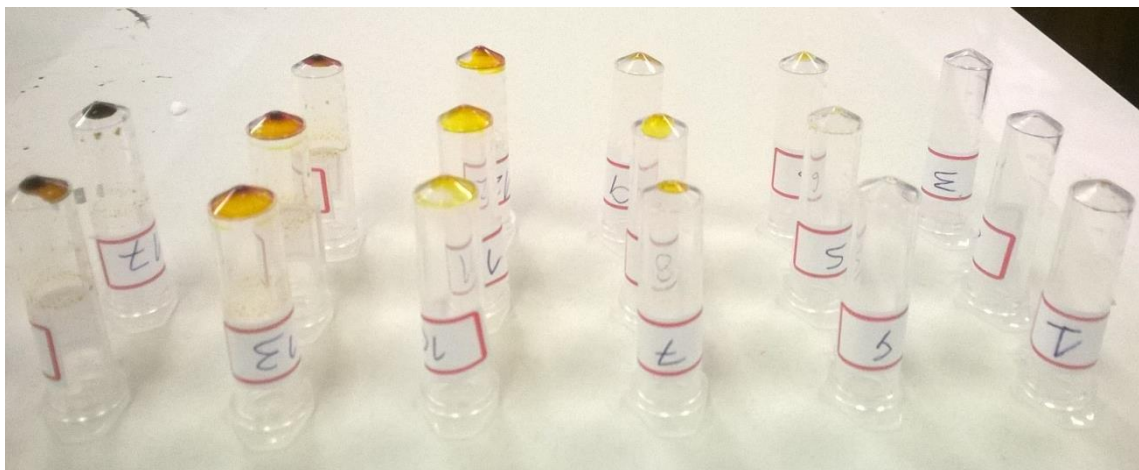


FIGURA 31 - ALÍQUOTA DE EXTRATOS SECOS APÓS SUBMISSÃO AO PROCESSO DE CLAREAMENTO POR ADSORÇÃO EM LEITO FIXO UTILIZANDO CARVÃO ATIVADO, NA ORDEM BAIXO PARA CIMA DA DIREITA PARA ESQUERDA

Na FIGURA 32 é apresentado o um diagrama da razão absorvância/massa de extrato em função do tempo de processo de absorção na coluna. Pode ser observado a partir desta figura o ponto de *breakthrough*, ou seja, o ponto no qual é observada a mudança drástica da razão absorvância massa de extrato, que indica o momento em que o leito de adsorvente foi saturado. Este é um parâmetro fundamental para o dimensionamento da coluna de adsorção de interesse, pois é possível relacionar a quantidade de adsorvente para da um dado intervalo tempo de operação nas condições de processo estabelecidas.

A partir da análise entre as FIGURA 31 e 32, o ponto de 60 min é determinado como *breakthrough* na FIGURA 32, facilitada sua identificação quando vista a mudança de cor do amarelo vivo para amarelo opaco na FIGURA 31.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho fica evidente a possibilidade do processo de clarificação do óleo de microalgas por meio da adsorção em leito de carvão ativado. Ressalta-se que este método pode ser aplicado para a clarificação deste tipo de óleo proveniente de qualquer processo de extração. No entanto, um estudo completo e mais aprofundado deve ser realizado para determinação das condições ótimas, além da oportunidade da comercialização deste óleo para outros fins, diferentes da destinação para biocombustíveis.

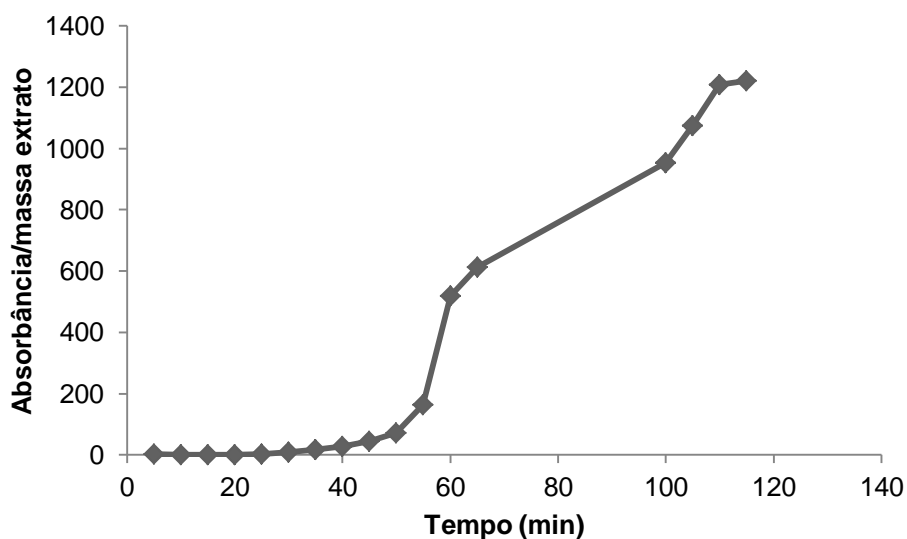


FIGURA 32 - CURVA DE ADSORÇÃO PARA SOLUÇÃO DE EXTRATO EM ETANOL UTILIZANDO CARVÃO ATIVO COMO ADSORVENTE E VAZÃO DE 3ML/MIN

4.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste trabalho colaboram para o entendimento do processo de extração proposto, como uma alternativa à metodologia convencional para extração de óleo de microalgas. Observou-se ainda baixa eficiência do uso de hexano como solvente para este tipo de processo.

Em relação à aplicação de ultrassom no processo de extração observou-se que ao menos uma das condições de extração, para ambos os solventes, apresentou resultados em rendimento de extrato superior ao da obtido na extração em Soxhlet. Ressalta-se ainda que estes resultados estão coerentes com valores apresentados na literatura, conforme TABELA 2. E evidencia o potencial produtor de biodiesel utilizando óleo de microalga, atendendo um dos grandes propósitos da busca por combustíveis alternativos, o não comprometimento da produção alimentícia, ou segurança alimentar.

O fato do etanol se mostrar um bom solvente pode propiciar uma grande economia em uma planta de médio-alta escala em relação a gasto energético e com operações unitárias, uma vez que não se faz necessária a remoção deste solvente para a etapa subsequente, a de esterificação ou alcoólise etílica.

Por fim, demonstrou-se a possibilidade de clarificação deste extrato por adsorção em carvão ativado, o qual pode agregar valor ao produto final.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi avaliado o método de extração por solventes assistida por ultrassom da microalga *Chlorella pirenoydosa* para estudo das melhores condições de rendimento em extraíveis em relação às variáveis de processo: Razão massa de microalga volume de solvente (RMV), Potência do banho (Pb) e Temperatura de extração (Tb), para dois diferentes solventes, etanol e hexano.

A extração assistida em ultrassom para obtenção de extrato de microalgas se mostrou eficiente quando comparada a metodologia tradicional, feita única e exclusivamente com solventes orgânicos em extrator do tipo Soxhlet. O processo aqui estudado também foi capaz de reduzir em 11 horas o tempo necessário para a obtenção do extrato, o que contribui para redução de gasto energético do método.

A comparação entre os dois solventes indicou o etanol como solvente compatível e eficiente, independente da metodologia. Tal fato tem como vantagem a possibilidade de submeter à solução extrato/etanol para a unidade de reação, sem a necessidade de separação do solvente (etanol), a fim de produzir ésteres etílicos oriundos de microalgas. Ainda, o modelo estatístico para análise dos resultados do planejamento foi validado por análise de variância para os dados obtidos apenas quando utilizado etanol, sendo a Pb a única variável significativa do processo.

Quando avaliado o rendimento do processo global foi possível obter 101 g de biodiesel (ésteres metílicos) para cada 1 kg de microalga utilizada, na melhor condição, ensaio ET 8 (RMV = 75 mg/mL; Pb = 100%; Tb = 60 °C). Além disto, a redução de escala proposta para as extrações assistidas em ultrassom mostrou ser adequada e capaz de reproduzir as condições normais.

O modelo matemático de segunda ordem utilizado para representar as cinéticas de extração do óleo de microalga em sistema assistido por ultrassom mostrou ser capaz de correlacionar de forma adequada os dados experimentais obtidos. A partir da análise destes resultados pode ser observado que o processo de extração é regido por duas fases distintas: convectiva e difusiva, em que a maior porção de extrato é obtida nos primeiros 10 min de extração.

Como última contribuição, os ensaios de adsorção em leito fixo de carvão ativado indicaram a possibilidade da aplicação desta técnica para a clarificação do

extrato resultante do processo de extração. O que contribui significativamente para agregar valor comercial ao produto obtido (óleo).

De uma maneira geral, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho observa-se que o uso de extração por etanol assistida em ultrassom é um método promissor para obtenção de óleo de microalgas, devido à aos altos rendimentos e altas taxas de extração obtidos em condições amenas de temperatura (temperatura ambiente). Além disso, observa-se que o óleo proveniente de microalgas apresenta um grande potencial para atender o mercado produtor de biocombustíveis e diminuir a disputa e concorrência deste mercado junto à indústria alimentícia.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Estudo de extração assistida por ultrassom utilizando microalga úmida com etanol em diferentes proporções;
- Aplicação de sondas de ultrassom em processos contínuos;
- Planejamento experimental de processo de remoção de clorofila utilizando carvão ativo como adsorvente, e dimensionamento de coluna ideal ao processo.

REFERÊNCIAS

ADAM, F.; ABERT-VIAN, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process; **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457–465, 2012.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011.

ANTONIOSI FILHO N. R.; LANÇAS, F.M. Identification of FAMEs using ECL values and a three-dimensional Kováts retention index system. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 18, p. 167-170, 2005.

ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. R. L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the potential extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 95-98, 2013.

BAHADAR, A.; KHAN, M. B. Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 128-148, 2013.

BALASUBRAMANIAN, R. K.; DOAN, T. T. Y.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 929-936, 2013.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP); **Boletim mensal do Biodiesel**, disponível em <<http://www.anp.gov.br/?dw=72910>>, Outubro de 2014; acesso em: 10/11/2014.

BRENNAN, L.; OWENDE P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuel and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, , p. 557-577, 2010.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, p.126-131, 2008.

CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel); **Química Nova**, v. 34, p. 477–486, 2011.

CORDEIRO, C. S.; **Compostos lamelares como catalisadores heterogeneos em relação de (trans)esterificação (m)etílica**. 2008. xxi, 168f. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química. Defesa: Curitiba, 16/12/2008.

CRUZ, R. S; FRANCO, A. L. C; LÔBO, I. P; TEIXEIRA, C. M. L. L; NETO, J. A. A; MENEZES, R. A. Biodiesel de microalgas: Avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, nº 3, p. 437-448, 2013.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, , p. 163-170, 2011.

DUVEKOT, C. **Determination of Total FAME and Linolenic Acid Methyl Ester in Biodiesel According to EN-14103**. Agilent Technologies, Inc. 2011.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION; **International carbon dioxide emissions from the consumption of energy**, Disponível em: <<http://www.eia.doe.gov/pub/international/iealf/tableh1co2.xls>>; Acesso em: 08/09/2014.

EPIGENTEK. **EpiSonic Multi-Functional Bioprocessor 11002014**, 2014. Disponível em <<http://www.epigentek.com/catalog/episonic-multi-functional-bioprocessor-1100-p-2997.html>>, Acesso em: 07/11/2014.

FOLEY, P. M.; BEACH. E. S.; ZIMMERMAN, J. B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1399-1405, 2011.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL; D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, , p. 175-181, 2012.

HALIM, R.; DANQUAH M. K.; WEBLEY P. W. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.

HALIM, R; GLADMAN, B; DANQUAH, M. K.; WEBLEY P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102 p.178–85, 2011.

HALIM, R.; RUPASINGHE, T. W.T.; TULL, D. L.; WEBLEY, P. A. Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 53-63, 2013.

KIRAN, B.; KUMAR, R.; DESHMUKH, D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. **Energy Conversion and Management**, 2014

KLEINEGRIS, D. M. M.; JANSSEN, M.; BRANDENBURG, W. A.; WIJFFELS, R. H. Two-phase systems: Potential for in situ extraction of microalgal products, **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 502-507, 2011.

LEE J.; YOO C.; JUN S.; AHN C. OH H. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S75-S77, 2010.

LEE, A.K.; LEWIS, D.M.; ASHMAN P.J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 89–101, 2012.

Liang Y. N, Sarkany N, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, **Biotechnol Lett**, v.31 p.1043–1049, 2009.

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

OLMSTEAD, I. L.D; KENTISH, S. E.; SCALES. P. J.; MARTIN, G. J.O. Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass, **Bioresource Technology**, v. 148, p. 615-619, 2013.

PEREIRA NETO, A. M.; DE SOUZA, R. A. S.; LEON-NINO, A. D.; DA COSTA, J.D. A.; TIBURCIO, R. S.; NUNES, T. A.; DE MELLO, T. C. S.; KANEMOTO, F. T.; SALDANHA-CORRÊA, F. M. P; GIANESELLA, S. M. F. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**, v. 55, n. 55, p. 525-531, 2013.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C.S.; Tecnologias de Produção de Biodiesel, **Revista Virtual de Química**, v.3, p. 385-405, 2011.

RASHID, N.; SAIF, M.; REHMAN, U.; SADIQ, M.; MAHMOOD, T.; HAN, J. I. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v 40, p. 760-778, 2014.

SAXENA, D. K.; SHARMA, S. K.; SAMBI, S. S. Kinetics and thermodynamics of cottonseed oil extraction. **Grasas y Aceites**, v. 62 (2), p. 198-205, 2011.

SAYYAR, S.; ABIDIN, Z. Z.; YUNUS, R.; MUHAMMAD, A. Extraction of Oil from Jatropha Seeds-Optimization and Kinetics. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6(7), p. 1390 -1395, 2009.

SCHUCHARDT U, SERCHELI R, VARGAS RM. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of. Brazilian. Chemical. Society**, v. 9(3): p. 199-210, 1998.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 277–286, 2010.

SILVA, Giselle de Souza. **Extração do óleo de microalgas para produção de biodiesel**. 2013. xii, 89 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Defesa: Curitiba, 02/08/2013.

SOH, L.; ZIMMERMAN, J. Biodiesel production: the potencial of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1422-1429, 2011.

TANG, S.; QIN, C.; WANG, H.; LI, S.; TIAN, S. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, , p. 44-49, 2011.

ZHU, L.D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J. J.; YUAN, Z. H.; WANG, Z. M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 1035-1046, 2014.