

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO BATISTA

**EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE
CHLORELLA PYRENOIDOSA
ASSISTIDA POR PRESSURIZAÇÃO
CÍCLICA: ESTUDO DE EQUILÍBRIO E
CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA – PPGEQ

GUSTAVO BATISTA

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE *CHLORELLA PYRENOIDOSA* ASSISTIDA
POR PRESSURIZAÇÃO CÍCLICA: ESTUDO DE EQUILÍBRIO E
CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Engenharia Química do Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Éverton Fernando Zanoelo
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA
2016

B333e

Batista, Gustavo

Extração de ácidos graxos de chlorella pyrenoidosa assistida por
pressurização cíclica : estudo de equilíbrio e caracterização dos extratos/
Gustavo Batista. – Curitiba, 2016.
112 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, 2016.

Orientador: Éverton Fernando Zanoelo – Co-orientador: Marcos Lúcio
Corazza.

Bibliografia: p. 83-96.

1. Pressão hidrostática. 2. Chlorella pyrenoidosa. 3. Biodiesel. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Zanoelo, Éverton Fernando. III. Corazza,
Marcos Lúcio. IV. Título.

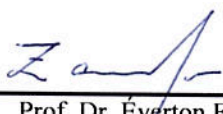
CDD: 662.88



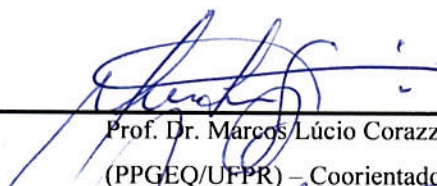
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ao primeiro dia do mês de março de 2016, no Auditório Superior do Prédio da Engenharia Química no Centro Politécnico – UFPR foi instalada pelo Dr. Éverton Fernando Zanoelo, professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a Banca Examinadora para a octogésima sexta 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 à determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, foi constituída professores doutores: Éverton Fernando Zanoelo (PPGEQ/UFPR), Marcos Lúcio Corazza (PPGEQ/UFPR), Alexandre Ferreira Santos (PPGEQ/UFPR) e Dirceu Noriler (DEQ/FURB). Às 14h00min, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Gustavo Batista** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “*Extração de ácidos graxos de *Chlorella pyrenoidosa* assistida por pressurização cíclica: Estudo de equilíbrio e caracterização dos extratos*”. 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, 01 de março de 2016.



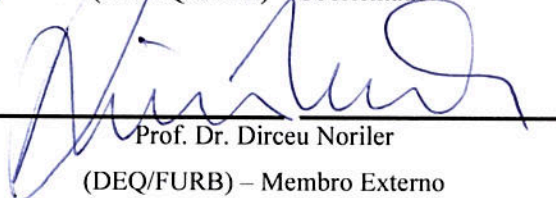
Prof. Dr. Éverton Fernando Zanoelo
(PPGEQ/UFPR) – Orientador



Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza
(PPGEQ/UFPR) – Coorientador



Prof. Dr. Alexandre Ferreira Santos
(PPGEQ/UFPR) – Membro Interno



Prof. Dr. Dirceu Noriler
(DEQ/FURB) – Membro Externo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao professor orientador Dr. *Éverton Fernando Zanoelo*, não só por todo o aporte técnico disponibilizado para a elaboração dos diversos experimentos e produções acadêmicas, mas acima de tudo pela atenção e cortesia sempre presentes, servindo como exemplo de pesquisador por excelência a seus orientados.

Ao professor coorientador Dr. *Marcos Lúcio Corazza*, por todo o conhecimento disponibilizado na área selecionada para o estudo, bem como pelo constante incentivo ao espírito investigativo e persistente que todo bom pesquisador deve ter.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida desde 2014.

Ao Coordenador do PPGEQ, *Alexandre Ferreira Santos*, e à Secretária *Cintya Kuznharski*, por estarem sempre prontos a auxiliar os alunos do Programa nos mais diferentes assuntos acadêmicos.

Aos companheiros de pesquisa *Heron Faggion* e *Ronald Wbeimar Pacheco Ortiz*, do PPGEAL, por dividirem comigo desde o início seus conhecimentos, suas conclusões técnicas e também o LETEX.

Aos marcantes parceiros de pesquisa do LACTA, em especial a *Alexis Escorsim* (com quem dividi alguns dos experimentos que aqui serão descritos), *Luiz Kanda* (por sempre estar disposto a auxiliar nos pequenos problemas experimentais), *Paulo Schizaki*, *Ana Luiza Christofis*, *Luana Almeida*, *Tailor Peruzzolo*, *Thiago Takashina*, *Laís Koop*, *Paloma Cabral* e *Amanda Guedes*.

Ao corpo técnico do LACTA e do LPE I, em especial à *Aline Lima*, *Fabiane Hamerski* e *Ivan Barros*, por toda a ajuda propiciada na elaboração e realização dos experimentos nestes Laboratórios.

Aos meus pais e familiares pelo incentivo.

À minha namorada, *Jéssica Consolin*, por jamais ter me deixado desistir de continuar este trabalho, mesmo nas horas mais difíceis.

E a todos que, mesmo aqui não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

**“Enquanto uns choram ... Outros vendem lenços.
Não existe crise para todo mundo ao mesmo tempo”**

(Título do livro de Maurício Werner)

RESUMO

Em face da constante busca atual por fontes limpas e economicamente viáveis de energia as microalgas estão consolidando um patamar de destaque. A matéria graxa extraível desses organismos é rica em compostos poliinsaturados que geram biodiesel de boa qualidade após a transesterificação. O rendimento em óleo, além disso, é muito maior que o obtido com oleaginosas tradicionalmente utilizadas na produção. No entanto, o processo de extração do óleo é um dos fatores que impedem, em maior escala, a adoção das microalgas como fonte consolidada de energia limpa. Este trabalho buscou avaliar o emprego da técnica de ciclos de pressão hidrostática (HPCE) para auxiliar a extração de óleos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, bem como realizar testes de caracterização nos lipídeos extraídos. Secagem prévia da biomassa indicou umidade de ~2,50% para o material, enquanto que o diâmetro médio da maior fração mássica de partículas obtida por peneiramento foi de 128 μm . A extração auxiliada por HPCE usando etanol apresentou melhoria da eficiência no equilíbrio (relativa à extração por Soxhlet), em seu caso mais significativo, de ~30%, quando comparada à extração comum por solvente, sendo ambas conduzidas a 30°C. As menores razões sólido-solvente apresentaram melhor rendimento de equilíbrio, sugerindo a existência de caminhos preferenciais para o solvente nos leitos maiores. Ocorreu retenção de soluto pela matriz sólida através de adsorção, descaracterizando esta matriz como fração inerte e contribuindo para o surgimento de grande diferença entre os valores de X_{Ae} e X_{le} . Esterificações pelo Método de Hartman-Lago foram conduzidas nos óleos extraídos por etanol e hexano, resultando em conversões de ~71% e ~64%, respectivamente. Teores mássicos de fósforo nos óleos extraídos de ~1,35% indicam a necessidade de degomagem antes da transesterificação industrial. Os mesmos óleos apresentaram teor relativamente baixo de acidez, ~0,64 mg de KOH / g de óleo, sendo constituídos principalmente por ácido palmítico (32,40% em massa). As clorofilas a e b foram quantificadas em amostras de microalga bruta e nos óleos dela extraídos, resultando em ~0,6% e entre 1,8 e 3,4% em massa respectivamente, indicando que estes pigmentos se concentram ainda mais no soluto seco.

Palavras-chave: Ciclos de pressão hidrostática; *Chlorella pyrenoidosa*; extração com etanol; biodiesel; Hartman-Lago; teor de fósforo; teor de clorofilas.

TITLE: FATTY ACIDS EXTRACTION OF *CHLORELLA PYRENOIDOSA* ASSISTED BY CYCLIC PRESSURIZATION: STUDY OF EQUILIBRIUM AND CHARACTERIZATION OF EXTRACTS

ABSTRACT

In face of the constant pursuit for clean and economically viable sources of energy, microalgae are cementing a featured status. The fatty matter extractable from these organisms is resourceful of polyunsaturated compounds that can generate high quality biodiesel after transesterification reaction. The oil yield, furthermore, is much higher than the yield obtained with oilseeds traditionally used on biodiesel's production. However, one of the factors that prevent on larger scale the selection of microalgae as a consolidated origin for clean energy is the process of extraction of oil. This study aimed to evaluate the use of hydrostatic pressure cyclic extraction (HPCE) technique on the improvement of the extraction of oils from *Chlorella pyrenoidosa* microalgae, as well as perform characterization tests on obtained lipids. A previous drying of the biomass indicated a moisture content of ~2,50%, while the medium diameter of major mass fraction of particles gathered by sieving was 128 μm . Hydrostatic pressure cyclic extraction using ethanol denoted an improve of efficiency at the equilibrium (concerning Soxhlet extraction) from ~30% on the most meaningful case, compared to solvent's simple extraction, being both conducted at 30°C. The smaller solid-solvent ratios resulted on better equilibrium yields, hinting the appearance of preferential paths for the solvent on larger beds. Solute's retention by the solid phase occurred by adsorption, discharging this phase as a inert fraction and contributing for the arise of great difference between the values of X_{Ae} and X_{le} . Esterifications with Hartman and Lago's method were conducted in the oils extracted with ethanol and hexane, resulting in conversions of ~71% and ~64%, respectively. Mass contents of phosphorus in the extracted oils of ~1,35% denote the requirement of degumming before the industrial transesterification. The same oils showed relatively low content of acid value, ~0,64 mg of KOH / g of oil, being composed mainly by palmitic acid (32,40% on mass). The a and b chlorophylls were quantified on raw microalgae samples and on the extracted oils, resulting in ~0,6% and in between 1,8 and 3,4% on mass respectively, indicating that these pigments are still more condensed on the dry solute.

Keywords: Hydrostatic pressure cycles; *Chlorella pyrenoidosa*; extraction with ethanol; biodiesel; Hartman-Lago; phosphorus content; chlorophyll content.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Cenário de consumo de biocombustíveis previsto até 2035.....	3
FIGURA 2 – Amostra de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	11
FIGURA 3 – Sistema de cultivo de microalgas <i>Chlorella</i> em lagoas circulares (Taiwan <i>Chlorella</i> Manufacturing Co. Ltd.).....	15
FIGURA 4A – Fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas desenvolvido por GRESSLER (2011).....	17
FIGURA 4B - Fotobiorreator da Saxony-Anhalt.....	17
FIGURA 5 – Peneiramento das microalgas <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	38
FIGURA 6 – Experimento de Soxhlet com hexano para a microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	40
FIGURA 7 – Béqueres, com massa oleosa extraída, após 24 horas de secagem em estufa.....	45
FIGURA 8 – Fase de compressão do conjunto de câmaras de extração auxiliada por prensa hidráulica	47
FIGURA 9 – Arranjo experimental para ensaios de extração com ciclos de pressão e descompressão (as mudanças de tonalidade nas colorações das barras indicam os tempos de tomada de amostra, e as mudanças de cor indicam as trocas das respectivas câmaras de extração no banho ultratermostático).....	48
FIGURA 10 – Preparação da centrifugação das amostras bifásicas do Método de Hartman-Lago.....	53
FIGURA 11 – A cor azul característica da solução de complexo ácido fosfomobilidato	55
FIGURA 12 - Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, Patm e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear.....	63
FIGURA 13 – Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, 200 kPa e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear.....	63
FIGURA 14 – Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, 400 kPa e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear.....	64
FIGURA 15 – Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, 600 kPa e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear.....	64
FIGURA 16 – Rendimentos de extração de equilíbrio obtidos em diferentes condições de pressão para RMM = 0,096.....	68

FIGURA 17A – Diagrama de Ponchon-Savarit para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em <i>Chlorella</i> à Patm e em diferentes RMM's.....	72
FIGURA 17B – Diagrama de McCabe-Thiele para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em <i>Chlorella</i> à Patm e em diferentes RMM's.....	72
FIGURA 17C – Diagrama de Ponchon-Savarit para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em <i>Chlorella</i> com HPCE a 200 kPa e em diferentes RMM's.....	72
FIGURA 17D – Diagrama de McCabe-Thiele para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em <i>Chlorella</i> com HPCE a 200 kPa e em diferentes RMM's.....	72
FIGURA 18 – Teores mássicos de clorofilas a + b para cada caso estudado	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Produtividade de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas	2
TABELA 2 – Produtividade em lipídeos de algumas espécies de microalgas	10
TABELA 3 – Efeito dos parâmetros principais de cultivo no perfil graxo das microalgas	14
TABELA 4 – Conteúdo lipídico majoritário extraído de microalgas de acordo com o solvente	19
TABELA 5 – Importantes métodos de extração em microalgas (Parte 1)	22
TABELA 6 – Experimentos de extração em microalgas mais relevantes encontrados na literatura	24
TABELA 7 – Alguns experimentos envolvendo HPCE já documentados (Parte 1).....	26
TABELA 8 – Valores definidos para as massas de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> internas aos sachês	42
TABELA 9 – Massas retidas no peneiramento das microalgas	59
TABELA 10 – Umidade em base úmida obtida para a <i>Chlorella</i>	60
TABELA 11 – Rendimentos de extração em <i>Chlorella</i> obtidos pelo Método de Soxhlet	61
TABELA 12 – Verificação da similaridade entre os valores de X_{le} obtidos em diferentes condições na RMM 0,096 (letras iguais ao lado de cada valor de X_{le} indicam casos que não diferem estatisticamente a um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))	65
TABELA 13 – Valores de X_{le} obtidos à pressão atmosférica em diferentes RMM's (letras iguais ao lado de cada valor de X_{le} indicam casos que não diferem estatisticamente a um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))	66
TABELA 14 – Valores de X_{le} obtidos à pressão de 200 kPa em diferentes RMM's (letras iguais ao lado de cada valor de X_{le} indicam casos que não diferem estatisticamente a um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))	67
TABELA 15 - Rendimentos de extração de equilíbrio em diferentes RMM's, à P_{atm} ou com HPCE a 200 kPa (condições seguidas de letras semelhantes tiveram resposta estatisticamente equivalente em um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$)).....	69
TABELA 16 – Dados relativos à retenção na matriz sólida para diferentes RMM's.....	71
TABELA 17 – Retenção de solvente exclusivamente no papel-filtro dos sachês de extração	71
TABELA 18 – Conversões experimentais dos óleos extraídos de <i>Chlorella</i> e esterificados pelo Método de Hartman-Lago	73
TABELA 19 – Teor de cinzas de amostras de <i>Chlorella</i> bruta e de óleo extraído	75
TABELA 20 – Dados obtidos para construção da curva padrão do experimento de estimativa do teor de fósforo nos óleos extraídos de <i>Chlorella</i>	75
TABELA 21 – Teores mássicos de fósforo obtidos por espectrofotometria nas amostras avaliadas	76
TABELA 22 – Teores de acidez e de ácido palmítico estimados para as amostras de óleo extraído de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	77
TABELA 23 – Resultados do experimento de determinação de teor de clorofila em amostras de <i>Chlorella</i> bruta e em seus óleos extraídos	79

LISTA DE SÍMBOLOS

A₆₄₉	Leitura de absorbância a 649 nm no espectrofotômetro
A₆₆₅	Leitura de absorbância a 665 nm no espectrofotômetro
CE	Mistura clorofórmio : etanol 2:1 em volume
CP	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
D	Coeficiente efetivo de difusividade no interior do sólido (m ² / s)
E	Solvente etanol puro
EA	Solvente etanol 4% em volume em água
EAM	Extração auxiliada por agitação magnética
EAU	Extração auxiliada por ultrassom
F	Valor F de Fischer
F*	Valor F de Fischer calculado na Análise de Variância (ANOVA)
f_A	Conteúdo de fósforo na alíquota da amostra (mg)
f_B	Conteúdo de fósforo na alíquota do branco (mg)
H	Solvente n-hexano
HL	Método de Hartman-Lago
k₁, k₂	Coeficientes efetivos de transporte de massa (s ⁻¹)
L₁	Massa estimada de solvente retido por massa de papel-filtro seco <i>m</i> ₁ (kg / kg)
M	Retenção de solvente pelos inertes (kg / kg)
M_a	Massa de lipídeos extraíveis que permaneceu na microalga mesmo após a extração (kg)
m_{af}	Massa do conjunto balão volumétrico + óleo extraído por Soxhlet depois da secagem em estufa (kg)
m_{ai}	Massa do balão vazio do experimento de Soxhlet (kg)
m_{am}	Massa total da amostra (g nos experimentos de quantificação de teor de fósforo e de teor de acidez; µg no experimento de quantificação de clorofilas)
m_{as}	Massa do conjunto placa de Petri + microalga antes da secagem (kg)
M_{b+a}	Massa do conjunto amostra pipetada + massa original do béquer (kg)
M_{pf}	Massa do conjunto béquer mais óleo extraído após secagem em estufa (kg)
M_{bi}	Massa do béquer vazio nos experimentos de extração (kg)
m_{ca}	Massa do cadinho vazio (kg)

m_{fc}	Massa final do conjunto cadinho + calcinado após dessecação (kg)
m_{dil}	Quantidade total de acetona 80% utilizada na diluição do extrato filtrado (mL)
m_m	Massa de microalga bruta inicial do teste (kg)
m_{ps}	Massa do conjunto placa de Petri + microalga depois da secagem (kg)
M_s	Massa total de solvente dentro da câmara de extração (kg)
m_{ss}	Massa do sachê seco após secagem em estufa (kg)
m_{su}	Massa do sachê úmido (logo após a extração) (kg)
M_{sv}	Massa inicial do sachê vazio (apenas o papel filtro) (kg)
N	Inverso da capacidade de retenção total da fase inerte (kg / kg)
η	Rendimento em óleo do experimento de extração exaustiva por Soxhlet (kg óleo obtido / kg microalga seca no sachê ou %)
NOR	Normalidade da solução padrão de NaOH
PBU	Variável potência do banho de ultrassom
q	Parâmetro da Equação 3 (0 para cartesianas, 1 para cilíndricas e 2 para esféricas)
r	Posição radial de difusão dos solutos dentro da partícula sólida (m)
RMM	Razão entre massa de microalga no sachê e massa de solvente (kg / kg)
RMV	Razão entre massa de microalga no sachê e volume de solvente (kg / L)
t	Tempo (s)
T	Variável temperatura
μ	Rendimento em óleo dos experimentos com câmaras de extração (kg óleo obtido / kg microalga seca no sachê ou %)
$U_{b.s.}$	Umidade em base seca (%)
$U_{b.u.}$	Umidade em base úmida (%)
U_P	Incerteza da medida relativa ao parâmetro P
V_a	Volume da alíquota no experimento de quantificação do teor de fósforo (mL)
V_{et}	Volume de etanol neutralizado gasto na titulação (mL)
X_{Ae}	Fração mássica de soluto que permaneceu no sachê após a extração considerando uma base livre de inertes (kg / kg)
X_l	Fração mássica de soluto na fase líquida (kg / kg)
X_{le}	Fração mássica de soluto em equilíbrio na fase líquida (kg / kg)
X_{li}	Fração mássica de soluto inicial na fase líquida (kg / kg)
X_s	Fração mássica de soluto na fase sólida (kg / kg)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEPPA	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (UFPR)
DAD	Detector de arranjo de diodos
EMAGs / FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EQ - UFPR	Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
HPCE	<i>Hydrostatic Pressure Cyclic Extraction</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEA	Agência Internacional de Energia
LACTA	Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (UFPR)
LETEx	Laboratório de Engenharia Teórica e Experimental (UFPR)
LPE I	Laboratório de Pesquisa Experimental I (UFPR)
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
P.A.	Pureza absoluta
Patm	Pressão atmosférica local (91,4 kPa)
PD&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
UV-Vis	Radiação ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivos específicos	4
1.2 TEMÁTICA	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 BIODIESEL	5
2.1.1 O Método de Hartman-Lago	6
2.1.2 O teor de acidez	7
2.1.3 O teor de fósforo	7
2.2 MICROALGAS	8
2.2.1 Caracterização das microalgas	8
2.2.2 Composição química das microalgas	9
2.2.2.1 Clorofilas	9
2.2.2.2 Remoção de clorofilas	10
2.2.3 <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	11
2.2.4 Compostos de interesse nas microalgas	12
2.2.5 Condições naturais de crescimento das microalgas	12
2.2.6 Produção em escala de microalgas	15
2.2.6.1 Raceways	15
2.2.6.2 Fotobiorreatores	16
2.3 EXTRAÇÃO DE ÓLEOS DE MICROALGAS	17
2.3.1 Extração por solvente	18
2.3.1.1 Aparato de Soxhlet	20
2.3.1.2 Retenção de solvente e solutos pela matriz sólida	20
2.3.2 Outras técnicas importantes de extração	21
2.3.3 Rendimentos de extração relevantes encontrados na literatura	21

2.4	EXTRAÇÃO CICLICAMENTE PRESSURIZADA (HPCE).....	25
2.5	MODELOS MATEMÁTICOS CLÁSSICOS DE EXTRAÇÃO.....	27
2.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE DADOS.....	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	MATERIAIS	31
3.1.1	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	31
3.1.2	Solventes	31
3.1.3	Peneira automática.....	32
3.1.4	Estufas de secagem	32
3.1.5	Dessecador.....	32
3.1.6	Aparato de Soxhlet.....	33
3.1.7	Sachês de microalga	33
3.1.8	Béqueres, pipetas, erlenmeyers e balões volumétricos	33
3.1.9	Recipientes de polietileno.....	34
3.1.10	Banho ultratermostático.....	34
3.1.11	Prensa hidráulica e suporte para compressão	35
3.1.12	Balança analítica	35
3.1.13	Termopar	35
3.1.14	Cronômetro.....	35
3.1.15	Reagentes para reações de caracterização	35
3.1.16	Centrífuga	36
3.1.17	Tubos de ensaio e cápsulas de centrifugação.....	36
3.1.18	Pipeta mecânica	37
3.1.19	<i>Eppendorfs</i>	37
3.1.20	Cadinhos, vidros-relógio e forno mufla	37
3.1.21	Espectrofotômetro	37
3.1.22	Titulador automático	38
3.2	MÉTODOS	38
3.2.1	Peneiramento das microalgas.....	38
3.2.2	Testes de secagem	39
3.2.3	Experimentos de extração exaustiva por Soxhlet.....	39
3.2.4	Estimativas da densidade real do etanol e de parâmetros como temperatura e RMM's dos experimentos	41
3.2.5	Experimentos de extração à pressão atmosférica em <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	42

3.2.6	Experimentos de extração com aplicação de ciclos de pressão hidrostática em <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	45
3.2.7	Experimento de avaliação da retenção de solvente e solutos por inertes	49
3.2.7.1	Os diagramas de McCabe-Thiele e Ponchon-Savarit.....	51
3.2.8	Esterificação pelo Método de Hartman-Lago.....	52
3.2.9	Determinação do teor de cinzas.....	54
3.2.10	Estimativa do teor de fósforo dos óleos extraídos de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> por espectrofotometria	54
3.2.11	Determinação do teor de ácidos graxos livres nos óleos extraídos	56
3.2.12	Quantificação de clorofilas nas amostras de <i>Chlorella</i> e em seus óleos	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1	PENEIRAMENTO DAS MICROALGAS.....	59
4.2	TESTE DE SECAGEM.....	60
4.3	EXPERIMENTOS DE EXTRAÇÃO EXAUSTIVA POR SOXHLET	60
4.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO AUXILIADA POR HPCE EM <i>CHLORELLA PYRENOIDOSA</i>	61
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS DIFERENTES RMM's SOBRE X_{fe}	66
4.6	ANÁLISE DOS DIFERENTES RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	67
4.7	AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE ÓLEOS NA MATRIZ SÓLIDA	70
4.8	ESTERIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE HARTMAN-LAGO	73
4.9	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS	74
4.10	ESTIMATIVA DO TEOR DE FÓSFORO EM <i>CHLORELLA PYRENOIDOSA</i> E NOS ÓLEOS DELA EXTRAÍDOS	75
4.11	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES NOS ÓLEOS EXTRAÍDOS	77
4.12	QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS EM <i>CHLORELLA</i> E EM SEUS ÓLEOS	78
5.	CONCLUSÕES	81
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
6.	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	97

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Com a adoção da gestão ambiental e do desenvolvimento sustentável por diversos segmentos as microalgas estão alcançando um patamar elevado como alternativa para produção limpa de energia.

De acordo com CHISTI (2007), diferentes estudos constataram que as microalgas possuem o mais elevado teor de matéria graxa (30 a 70% de lipídios na massa seca, dos quais de 25 a 60% são ácidos graxos poliinsaturados). Além disso, após a retirada do óleo, a biomassa residual apresenta potencial para a produção de biogás e bioetanol (MATA *et al.*, 2009; HARUN *et al.*, 2010), tornando-se uma excelente alternativa para a produção de biocombustíveis.

A escolha correta da matéria-prima é de grande importância na produção de biodiesel, uma vez que representa de 50 a 85% do custo total envolvido e pode gerar impacto significativo na produção de alimentos (RAMOS *et al.*, 2003; TEIXEIRA; MORALES, 2011; SUAREZ *et al.*, 2007). O rendimento anual em óleo das microalgas, em litros por hectare, é muito superior ao melhor rendimento obtido com oleaginosas tradicionais (como soja, girassol e dendê), conforme visto na Tabela 1. COHEN *et al.* (1986) ressaltam que muitas espécies de microalgas podem crescer em outros lugares que não terras agrícolas e florestas, e mais rapidamente que as plantas terrestres, possibilitando maior produtividade. Além disso, o cultivo e colheita podem ocorrer em regime contínuo, dispensando o uso de safras. O ciclo de vida curto desses organismos facilita a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies, enquanto que a natureza unicelular assegura uma biomassa com composição bioquímica homogênea, diferentemente dos vegetais superiores.

Segundo BARROS (2010), fatores como elevada produtividade de biomassa, baixas taxas de subsídios químicos e energéticos e reduzida demanda por área de cultivo tornam a produção em escala industrial de microalgas promissora para a geração de benefícios sociais, ambientais e econômicos. O cultivo de microalgas poderá se tornar uma prática socioeconômica muito promissora no Brasil devido às condições climáticas adequadas e às fontes hídricas abundantes.

TABELA 1 - Produtividade de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas

Matéria-prima	Teor de óleo (%)	Produtividade em óleo (L/ha/ano)	Área necessária (m²/ano/kg)	Produtividade em biodiesel (kg/ha/ano)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Pinhão-manso	28	741	15	656
Canola	41	1.190	12	862
Girassol	40	1.070	11	942
Mamona	48	1.307	9	1.156
Palma	36	5.366	2	4.747
Microalga (baixo teor de óleo)	10	19.566	0,6	17.309
Microalga (médio teor de óleo)	30	58.700	0,2	51.927
Microalga (alto teor de óleo)	50	97.800	0,1	86.515
Microalga (maior teor de óleo)	70	136.900	0,1	121.104

FONTE: Adaptado de CHISTI (2007) e MATA *et al.* (2010)

Devido à expectativa de crescimento do interesse mundial no biodiesel e em outros biocombustíveis (conforme indica o gráfico da Figura 1), há um grande número de projetos que vem sendo desenvolvidos com plantas oleaginosas para a produção de matéria-prima deste biocombustível, e as microalgas surgem como alternativa neste estudo. No Brasil, foi lançado em 2008 pelo MCTI, através do CNPq, edital de pesquisa com o objetivo de selecionar projetos voltados para uso de microalgas para a produção de biodiesel, no valor total de R\$ 4,5 milhões. Foram apresentadas 63 propostas de projetos de PD&I para as mais variadas áreas. Em 2010, outra ação do MCTI lançou o projeto MCT/FINEP “Produção de biodiesel derivado de óleos de microalgas”, reunindo diferentes universidades e institutos de pesquisa do país (FRANCO *et al.*, 2013).

Diversos autores têm trabalhado na prospecção de microalgas adequadas para a produção em escala industrial do biodiesel, bem como na busca por técnicas inovadoras para extração dos óleos. A extração apresenta parcela significativa do custo final e, portanto, pode determinar a sustentabilidade da produção nas mais diversas fontes. Ela representa a principal limitação para produção de variedades de baixo custo, como combustíveis e alimentos, além de coprodutos de alto valor agregado, como o β -caroteno e os polissacarídeos.

Diversos trabalhos já abordaram a extração de ácidos graxos em microalgas pelo método de extração por Soxhlet, e também pelo uso de técnicas auxiliares,

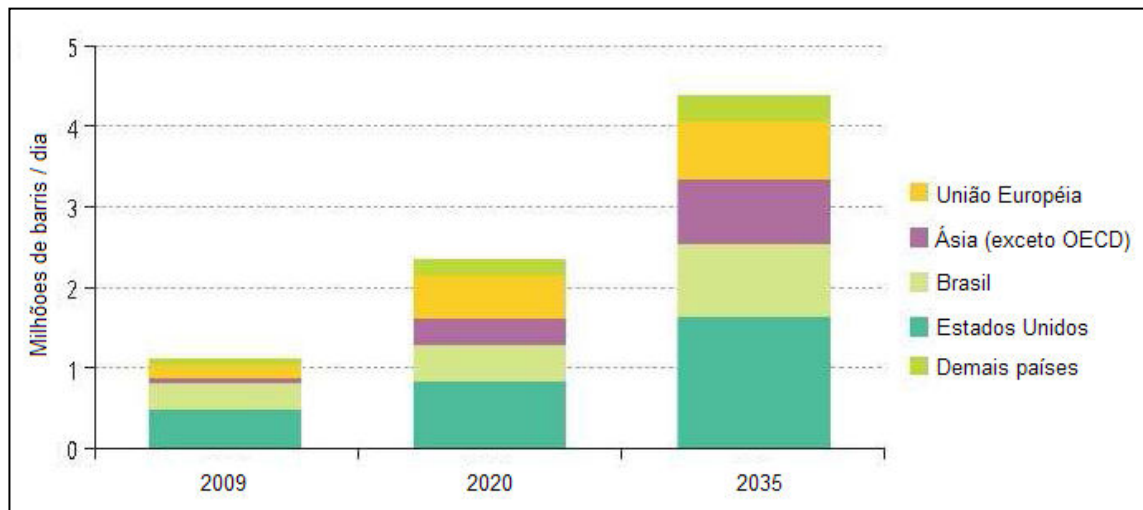


FIGURA 1 – Cenário de consumo de biocombustíveis previsto até 2035

FONTE: IEA / OCDE (2010)

como banhos de ultrassom e outras aplicações modernas, na maioria sendo baseadas na ruptura da parede celular dos organismos. Porém, um problema sempre pertinente é o do custo final envolvido. Fatores econômicos retardam majoritariamente a aplicação concreta destas soluções. A extração auxiliada por ultrassom, por exemplo, que apresentou em laboratório resultados muito apreciáveis, é uma técnica relativamente dispendiosa.

Inserido neste contexto, este trabalho visa à pesquisa da extração de óleos em microalgas auxiliada por uma técnica que, a princípio, é bastante simples e que possui baixo custo de implantação e de manutenção (BATISTA *et al.*, 2015). Tem-se expectativa no aumento do rendimento em ácidos graxos extraídos, uma vez que há diversas aplicações anteriores reportadas em literatura que já obtiveram sucesso em outros casos. Trata-se da extração auxiliada pela aplicação de ciclos de pressão hidrostática, doravante denominada HPCE. Não se encontrou na literatura caso prévio de estudo envolvendo a HPCE em *Chlorella pyrenoidosa* ou em qualquer outra espécie de microalga.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é avaliar os efeitos da aplicação de ciclos de pressão hidrostática no equilíbrio de extração dos ácidos graxos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

1.1.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Verificar se há aumento do rendimento de extração de ácidos graxos em microalgas usando HPCE (comparado com a extração conduzida a pressões atmosféricas);
- Avaliar os rendimentos de esterificação dos óleos obtidos por extração em *Chlorella pyrenoidosa* utilizando HPCE;
- Verificar a retenção de solventes e solutos pelos inertes presentes na biomassa de *Chlorella*;
- Caracterização das variedades de ácidos graxos obtidas por extração em *Chlorella pyrenoidosa*.

1.2 TEMÁTICA

No Capítulo 2 deste trabalho é feita uma revisão bibliográfica sobre o biodiesel (incluindo os meios principais de produção e de caracterização deste biocombustível) e sobre as microalgas, descrevendo tópicos de caracterização, composição, produção em escala e métodos de extração aplicáveis (incluindo a HPCE).

No Capítulo 3 são descritos os materiais utilizados no experimental que foi conduzido, bem como as metodologias adotadas para extração, esterificação e caracterização dos óleos de *Chlorella pyrenoidosa*.

O Capítulo 4 mostra os resultados obtidos através dos experimentos ilustrados no Capítulo 3 e também discussões acerca dos resultados apresentados.

O Capítulo 5 resume as conclusões obtidas através do estudo, conforme os objetivos traçados na Seção 1.1, e elenca sugestões para trabalhos futuros na área estudada.

O Capítulo 6 apresenta as referências utilizadas neste documento. E por fim há a Seção de Anexos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

Biodiesel é o nome dado à mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, derivada de biomassa renovável, que atende a determinados parâmetros de qualidade estabelecidos em norma e que pode ser utilizado em qualquer motor que funcione a ciclo Diesel (ANP, 2012).

Entre as fontes mais promissoras de bioenergia, o biodiesel se destaca por ser renovável, não tóxico, livre de enxofre e de aromáticos, biodegradável, e ainda com propriedades físico-químicas relativamente semelhantes às do diesel oriundo do petróleo (FERREIRA, 2010), tendo desempenho muito próximo (BOROWITZKA *et al.*, 1998). Os principais problemas inerentes a este biocombustível são o alto custo de produção (quando comparado ao diesel comum e a outros combustíveis fósseis) e a produção de maiores quantidades de óxidos de nitrogênio durante a degradação (BAN-WEISS *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, o biodiesel é produzido através das reações de transesterificação (ou alcoólise) de triacilgliceróis (produto da combinação entre ácidos graxos e glicerina), empregando geralmente catalisadores alcalinos como hidróxidos de sódio e potássio ou alcóxidos, ou da esterificação de ácidos graxos livres, com uso de catalisadores ácidos (DABDOUB *et al.*, 2009). A transesterificação, o processo mais utilizado para produção, consiste na reação reversível da matriz oleosa com excesso de alcoóis de cadeia curta (como metanol e etanol) para a formação de monoésteres e glicerol. A reação ocorre em etapas, sendo que os triacilgliceróis se convertem em diacilgliceróis, que por sua vez se convertem em monoacilgliceróis, que ao final se reduzem a monoésteres alquílicos e glicerol (FUKUDA *et al.*, 2001; AHMAD *et al.*, 2011). Apenas os triacilgliceróis são facilmente convertidos em biodiesel pelo método de transesterificação (FRANCO *et al.*, 2013). Matérias-primas como resíduos de óleos e gorduras, óleos vegetais e

gorduras animais podem ser empregadas na produção (CHISTI, 2007).

2.1.1 O Método de Hartman-Lago

Dá-se o nome de procedimentos de esterificação às sequências de reações químicas responsáveis por converter ácidos graxos, normalmente extraídos de matrizes vegetais e animais, em compostos mais voláteis conhecidos como ésteres metílicos de ácidos graxos (popularmente conhecidos como EMAG's ou FAME's).

Os métodos de esterificação normalmente são subdivididos em duas categorias: catálise ácida e catálise básica. Os reagentes mais utilizados na catálise ácida são o ácido clorídrico (HCl), o ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. Na catálise básica, são comumente utilizados hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) em metanol, e metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol (MILINSK, 2007). A catálise ácida é utilizada na esterificação tanto de acilgliceróis quanto de ácidos graxos livres, porém requer aquecimento. Já a catálise básica é geralmente mais rápida e pode ser conduzida à temperatura ambiente, reduzindo o risco de decomposição de ácidos graxos poliinsaturados. Porém, é incapaz de converter os ácidos graxos diretamente em FAME's (MILINSK, 2011).

O Método de Hartman e Lago emprega reagentes comuns, proporcionando rapidez, simplicidade e baixo custo. Entretanto, geralmente requer mais vidrarias e maiores manipulações. A catálise básica é feita com uma solução de NaOH em metanol, enquanto que a catálise ácida envolve solução de NH₄Cl em metanol com posterior adição de H₂SO₄. A separação entre as fases se dá pela adição de solventes de polaridade fortemente divergente (água deionizada e heptano).

Os trabalhos de MILINSK *et al.* (2011) e KUS *et al.* (2009) compararam o Método de Hartman e Lago com outras metodologias de esterificação, como o Método IUPAC e o *in situ*. Com ressalvas de tempo de reação e número de procedimentos, o Método de Hartman e Lago apresentou desempenhos satisfatórios de esterificação, comparáveis aos obtidos pelos métodos IUPAC e *in situ*.

2.1.2 O teor de acidez

A resistência à oxidação é um aspecto relevante dentro do ciclo de existência do biodiesel, uma vez que os óleos vegetais contendo ésteres de ácidos graxos insaturados são bastante sensíveis. Condições adversas, como calor, umidade, ar atmosférico, presença de metais e radiação ultravioleta induzem ao processo oxidativo, mesmo em curtos períodos de exposição. Os produtos gerados podem causar corrosão no motor e obstrução nos filtros e no sistema de injeção (LIANG *et al.*, 2006; FONTANA, 2011).

A decomposição dos glicerídeos é quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Parâmetros físico-químicos como o índice de acidez, o índice de iodo e o índice de peróxidos são indicadores de degradação de óleos. O índice de acidez é definido como o número de miligramas de KOH necessários para neutralizar os ácidos livres em 1 g de amostra. Altos índices de acidez têm efeito bastante negativo sobre a qualidade do óleo, podendo catalisar reações intermoleculares e, no caso dos óleos combustíveis gerados, gerando ação corrosiva nas partes metálicas do motor (MAGALHÃES, 2012).

2.1.3 O teor de fósforo

Compostos inorgânicos estão presentes em toda a cadeia produtiva do biodiesel. No Brasil, há especificações da ANP de limites máximos de fósforo (10 mg / kg), enxofre (10 mg / kg), e somas de cálcio e magnésio (5 mg / kg) e sódio e potássio (5 mg / kg) para todo biodiesel comercializado no país (ANP, 2012).

O fósforo e o enxofre presentes no biodiesel são originários das etapas de extração de óleos, na forma de fosfolipídios e glucosinatos, respectivamente. Diversos fatores, como matéria-prima, métodos de extração e purificação, métodos de produção e condições de armazenamento podem influenciar na concentração destes elementos no óleo final. Fósforo e enxofre são potenciais envenenadores dos catalisadores veiculares (QUADROS *et al.*, 2011).

O monitoramento do fósforo em óleos vegetais é de suma importância, já que os fosfolipídeos são responsáveis pelo aumento na formação de gomas que prejudicam severamente a qualidade do óleo combustível. Por isso, antes da transesterificação industrial, há a degomagem, que consiste na remoção deste

composto juntamente às outras impurezas, substâncias coloidais e íons metálicos. A alta quantidade de fósforo e seus derivados e a redução de rendimento da reação são dois dos principais problemas que inviabilizam a produção de biodiesel a partir de óleos brutos (QUADROS *et al.*, 2011).

2.2 MICROALGAS

O termo “microalgas” é utilizado para designação de diversos agrupamentos diferentes de organismos vivos, variando desde grupos de seres unicelulares até organismos multicelulares. Como “microalgas” também pode ser descrita uma gama de seres de estrutura celular procariótica (semelhantes às cianobactérias) e eucariótica que, mesmo sendo estruturalmente e morfológicamente diferentes entre si, são fisiologicamente parecidos, e que possuem metabolismo semelhante ao dos vegetais superiores, produzindo através do processo de fotossíntese compostos como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e hidrocarbonetos (CHISTI, 2008).

2.2.1 Caracterização das microalgas

As microalgas são os principais produtores primários de oxigênio, e produzem cerca de 60% da biomassa primária do planeta, sendo imprescindíveis para todos os seres vivos (MULDER, 2009). Estima-se que mais de 50.000 espécies de microalgas diferentes existam, mas apenas cerca de 30.000 já foram estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004).

Microalgas são encontradas em diversos lugares, principalmente no meio marinho e em rios e lagos de água doce. Porém há diversas variedades comumente encontradas em terra firme. Diante do grande número de espécies, são classicamente subdivididas em grandes agrupamentos, principalmente devido à pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. Algumas classes mais importantes são: algas verdes (*Chlorophyceae*), algas verde-amarelas (*Xanthophyceae*), algas vermelhas (*Rhodophyceae*), algas marrons (*Phaeophyceae*), diatomáceas (*Bacillariophyta*), cianobactérias (*Cyanophyceae*), dinoflagelados (*Dinophyceae*) e picos-plâncton (*Prasinophyceae*; *Eustigmatophyceae*) (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; BRENNAN e OWENDE, 2010).

2.2.2 Composição química das microalgas

A variação da composição química para diferentes espécies de microalgas é expressiva, sobretudo em relação ao tipo e teor de ácidos graxos encontrados. Enquanto algumas microalgas tem destacada produção de poliinsaturados de cadeia longa (PUFA's), outras acumulam boas quantidades de ácidos graxos menores com cadeias saturadas ou com diferentes padrões de monoinsaturação (COBELAS e LECHADO, 1989; BOROWITZKA *et al.*, 1998). Essencialmente são encontrados ácidos graxos insaturados, como o palmitoleico (16:1), o oleico (18:1), o linoleico (18:2) e o linolênico (18:3), enquanto que ácidos graxos saturados são geralmente encontrados em menores quantidades (KHAN *et al.*, 2009; D'OCA *et al.*, 2011).

Propriedades como a massa específica, a viscosidade cinemática, o ponto de entupimento do filtro do motor a frio e a estabilidade oxidativa do biodiesel são altamente influenciadas pelos triacilgliceróis geradores (FRANCO *et al.*, 2013). Os compostos de cadeia saturada apresentam a vantagem de possuir maior estabilidade à auto-oxidação. Em contrapartida, ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeias longas e de cadeias saturadas têm maior tendência de solidificação à baixa temperatura, podendo tornar o biodiesel impróprio para uso em climas frios. A presença de cadeias insaturadas no óleo extraído de microalgas, embora torne mais suscetível à oxidação no armazenamento, torna o biodiesel gerado muito física e quimicamente semelhante ao diesel de petróleo, amenizando a possibilidade de gelificação (DABDOUB *et al.*, 2009; BRENNAN e OWENDE, 2010).

Um extenso trabalho empreendido de 1978 a 1996 no *US National Renewable Energy Laboratory* (NREL) denominado *The Aquatic Species Program* (ASP) identificou que as microalgas verdes e as diatomáceas representam o melhor rendimento em óleo para biodiesel (PEREZ, 2007). A Tabela 2 resume a produtividade esperada em lipídeos de algumas das principais espécies de microalgas.

2.2.2.1 Clorofilas

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas. Ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. São moléculas que possuem originalmente o magnésio como átomo central.

TABELA 2 – Produtividade em lipídeos de algumas espécies de microalgas

Microalga	Produtividade de lipídeos (mg/L/dia)	Volume de biomassa produzido (g/L/dia)	Área destinada à produção (g/m ² /dia)
<i>Chlorella emersonii</i>	10,3 - 50,0	0,036 - 0,041	0,91 - 0,97
<i>Chlorella vulgaris</i>	11,2 - 40,0	0,02 - 0,20	0,57 - 0,95
<i>Chlorella sp.</i>	42,1	0,02 - 2,5	1,61 - 25
<i>Nannochloropsis sp.</i>	36,7 - 90,0	0,17 - 1,43	1,9 - 5,3
<i>Scenedesmus sp.</i>	40,8 - 53,9	0,03 - 0,26	2,43 - 13,52
<i>Tetraselmis suecica</i>	27,0 - 36,4	0,12 - 0,32	19

FONTE: Adaptado de MATA *et al.* (2010)

A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, enquanto que a clorofila *b* está presente apenas em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias (STREIT *et al.*, 2005).

Em geral, as clorofilas são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, presença de oxigênio e à degradação química (SCHOEFS, 2002). A rota principal da degradação das clorofilas, de cor verde vívida, é por feofitinação direta ou indireta, gerando feofitina, que tem como característica a cor marrom-azeitona. Na feofitinação, o magnésio do centro da molécula de clorofila é substituído por hidrogênio (STREIT *et al.*, 2005).

Na produção industrial do biodiesel, a clorofila é geralmente retirada do óleo de refino na etapa de neutralização, junto com fosfatídeos residuais e os carotenóides. Entretanto, a presença de quantidades residuais pós-tratamento destes potentes agentes oxidantes não é incomum, de modo que diversos estudos buscam soluções rápidas e baratas para este problema (MARQUES *et al.*, 2014; BRANDALIZE, 2014).

2.2.2.2 Remoção de clorofilas

Solventes polares como a acetona, o metanol, o etanol e o acetato de etila são os mais eficazes na extração completa das clorofilas. No entanto, outras metodologias vêm sendo desenvolvidas, na busca pela remoção completa deste pigmento visando à produção do biodiesel.

MARQUES *et al.* (2014) realizaram a extração de pigmentos através de método baseado em banho de ultrassom, utilizando posteriormente Na₂SO₄ para a

separação da fase inorgânica. Também realizaram separação analítica em HPLC / DAD, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol, acetonitrila e água. As clorofilas e feofitinas representaram aproximadamente 97% dos pigmentos extraídos, sendo que aproximadamente 3 µg / g foram detectados no biodiesel obtido por transesterificação direta de biomassa de *Chlorella sp.* Já MAGALHÃES (2012) não identificou grande interferência da clorofila no espectro de absorção de biodiesel purificado através de espectroscopia UV-Vis.

Argilas com propriedades adsorventes, geralmente obtidas de esmectitas tratadas com ácidos inorgânicos fortes, já foram testadas com sucesso para a remoção da clorofila de óleos vegetais, conforme documentado por SILVA *et al.* (2013) e PATRÍCIO *et al.* (2014). Também são encontrados processos baseados em membranas poliméricas de ultrafiltração (SILVA *et al.*, 2006), sílicas e carvão ativado (BRANDALIZE, 2014).

2.2.3 *Chlorella pyrenoidosa*

As microalgas *Chlorella pyrenoidosa* (Figura 2) são organismos unicelulares de água doce. Possuem conteúdo elevado de clorofila que caracteriza a cor verde-esmeralda. São compostas em média por 65% de proteína, 13% de carboidratos, 9% de gorduras e 6% de minerais biodisponíveis (DHYANA e POTTER, 1984).

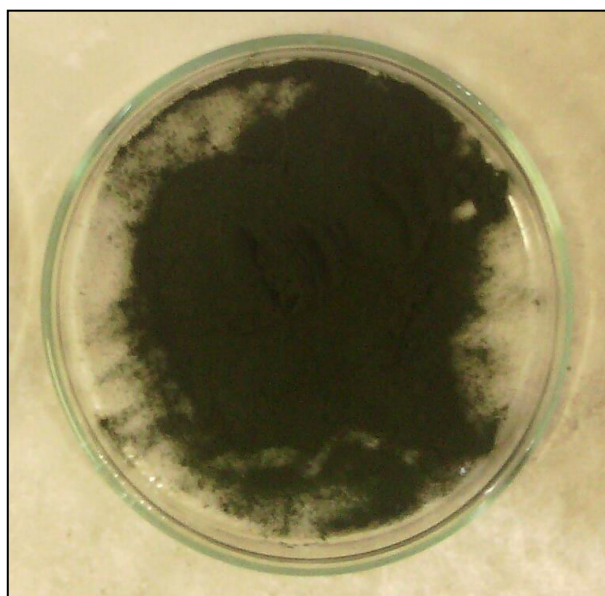


FIGURA 2 – Amostra de *Chlorella pyrenoidosa*

A literatura apresenta valores diversificados para o conteúdo lipídico da *Chlorella pyrenoidosa*, encontrando-se valores desde 2% (BECKER, 1994). Análises cromatográficas conduzidas por PEQUENO *et al.* (2012) nestes organismos indicaram presença considerável de ácidos graxos saturados (51,08% do total de óleo extraído), sobretudo o palmítico (35,97%). O perfil graxo da *Chlorella pyrenoidosa*, assim como ocorre com outras microalgas, sofre variações a partir do meio de cultivo empregado, assunto que será melhor detalhado na seção 2.2.5.

2.2.4 Compostos de interesse nas microalgas

Microalgas possuem grande potencialidade nos âmbitos biotecnológico e comercial devido à importância dos compostos resultantes da sua biomassa (RICHMOND, 2004). Além dos ácidos graxos poliinsaturados, microalgas diversificadas retêm compostos extraíveis como polissacarídeos, antioxidantes, corantes industriais e alimentícios, substâncias com atividade biológica, toxinas (PULZ *et al.*, 2004), enzimas, antibióticos, hidrocarbonetos, vitaminas (RICHMOND, 2004), e biopolímeros como os alginatos, o ágar e as carragenanas (FONTANA, 2011).

A biotecnologia das microalgas mostra-se versátil, sendo que estes organismos podem ser empregados no tratamento de efluentes, nutrição, saúde humana e animal, biorremediação de metais pesados, produção de rações e fertilizantes, produção de energia renovável e até mesmo na química fina (BECKER, 2004; RICHMOND, 2004; DERNER *et al.*, 2006). HOLANDA e RAMOS (2011) analisaram a viabilidade econômica da geração de eletricidade através da queima da biomassa das microalgas, obtendo um processo rentável e com retorno já no primeiro ano de produção.

2.2.5 Condições naturais de crescimento das microalgas

A reprodução e o crescimento das microalgas dependem de conjuntos de fatores químicos, físicos e biológicos. A capacidade intrínseca de produzir óleo em grandes quantidades é característica de apenas algumas espécies individuais e de algumas linhagens (HU *et al.*, 2006). Todavia, as espécies com conteúdo mais

elevado em matéria graxa não são necessariamente as mais rápidas para se reproduzir (PÉREZ, 2007).

Além da escolha da variedade produtora de óleo mais adequada, fatores como pH, quantidade e qualidade dos nutrientes, aeração, intensidade de luz, tempo de fotoperíodo, salinidade e temperatura devem ser controlados durante o cultivo, de acordo com os ácidos graxos desejados ao final da extração (CERTIK e SHIMIZU, 1999; XU *et al.*, 2006). Isto porque estes organismos podem alterar seu metabolismo de acordo com as mudanças na composição química do meio (BEHRENS e KYLE, 1996; MATA *et al.*, 2010). A acumulação de lipídios nas microalgas ocorre tipicamente durante períodos de estresse ambiental (PÉREZ, 2007). Algas verdes oleaginosas podem duplicar ou até mesmo triplicar sua massa seca em óleo quando expostas a meios foto-oxidativos ou com falta de nutrientes específicos (BASOVA, 2005).

O cultivo em meios autotróficos ocorre na presença de luz, advindo desta última a energia para que as microalgas fixem carbono e produzam biomassa. Devido à fotoinibição, o excesso de luz em dias muito ensolarados pode levar ao crescimento lento das culturas, acarretando em menor produção celular (ZY *et al.*, 2003). O sistema autotrófico é atualmente a única metodologia economicamente viável para produção de microalgas em escala industrial (BRENNAN e OWENDE, 2010; CHISTI, 2007).

O sistema heterotrófico de produção, apesar de mais caro, apresenta vantagens como a eliminação da exigência de luz, maior controle do processo e baixo custo de colheita de biomassa. As fontes de carbono e de nutrientes empregadas são preferencialmente de baixo custo (HUANG¹ *et al.*, 2009), tendo como exemplos a glucose, a sacarose, a galactose e a manose (AMARO *et al.*, 2011).

A faixa de temperatura ótima para o crescimento e desenvolvimento das microalgas, em suas mais diversas espécies, é a temperatura ambiente, de 20 a 35°C, embora SCHIMIDT (2007) recomende uma faixa mais restrita, de 18 a 22°C. Os nutrientes básicos para o crescimento incluem nitrogênio, fósforo, enxofre e ferro, e em menor quantidade são também necessários magnésio, cálcio e sílica. Na prática, água do mar complementada com nitratos e micronutrientes comerciais é utilizada (BREITMAN e HSU, 2010). Dependendo do pH do meio, elementos químicos podem se cristalizar ou precipitar, afetando sua disponibilidade. O pH ideal

de cultivo é próximo do neutro, e isso é obtido na prática com o uso de soluções-tampão (LOURENÇO, 2006).

Limitando-se a concentração de nitrogênio no meio de cultura, provoca-se uma diminuição na concentração de proteínas, carotenóides e clorofila, aumentando a porcentagem lipídica (SANTOS *et al.*, 2003). Nesta condição, RAMAZANOV e RAMAZANOV (2006) obtiveram 18,9% em conteúdo lipídico para a *Chlorella pyrenoidosa*. Otimizando ainda outras condições, os mesmos autores conseguiram 22,2%. Para uma cepa mutante da mesma espécie, foram obtidos 25,2% 38,0% nas mesmas condições respectivas (SILVA, 2013).

Na Tabela 3, adaptada de BEHRENS e KYLE (1996), são mostrados os efeitos esperados no perfil dos ácidos graxos posteriormente extraíveis em função de alterações nas variáveis principais de cultivo das microalgas.

A equipe do Instituto de *Biodesign* da *Arizona State University* (ASU) desenvolveu recentemente um processo denominado “*Thermorecovery*”, em que, sob condições controladas de calor, as microalgas passam a produzir lipases que degradam suas próprias membranas celulares, facilitando a extração posterior dos ésteres graxos. Quando expostas à temperatura de 46°C, as amostras de *Feridobacterium nodosum* apresentaram resultados satisfatórios (LIU *et al.*, 2008).

TABELA 3 – Efeito dos parâmetros principais de cultivo no perfil graxo das microalgas

Parâmetro de cultivo	Efeito esperado no perfil graxo extraível
Baixa concentração de nitrogênio	Aumento do conteúdo lipídico
Alta concentração de nitrogênio	Diminui a quantidade de C ₂₂
Aumento da intensidade luminosa	Aumenta a quantidade de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Presença de íon Mn ²⁺	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de CO ₂	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Baixa concentração de Fósforo	Aumenta o conteúdo lipídico

FONTE: Adaptado de BEHRENS e KYLE (1996)

2.2.6 Produção em escala de microalgas

A tecnologia de produção em escala para microalgas visa à produção altamente eficiente e com custos minimizados. Do valor total para produção de biomassa em escala, aproximadamente 35% tem relação com o meio de cultivo empregado (GRIMA *et al.*, 1994). Com base nos principais produtores mundiais, estima-se que a produção atual de biomassa algal seja de 38 milhões de litros, concentrados principalmente na China, Japão, Taiwan, Estados Unidos e Índia (FRANCO *et al.*, 2013).

Há dois métodos principais para o cultivo destes organismos: os tanques e lagoas abertos, conhecidos como *Raceways*, e os sistemas fechados, conhecidos como fotobiorreatores (RICHMOND, 2004).

2.2.6.1 *Raceways*

O sistema *Raceways*, também conhecido como sistema aberto de cultivo para microalgas, consiste em canais abertos feitos no solo com aproximadamente 0,3 metros de profundidade, que podem ser de concreto ou de chão batido revestido por polietileno de baixa densidade (PEBD). Na Figura 3 há um exemplo deste arranjo.



FIGURA 3 – Sistema de cultivo de microalgas *Chlorella* em lagoas circulares
(Taiwan *Chlorella* Manufacturing Co. Ltd.)

FONTE: AZEREDO (2012)

Comparados aos biorreatores, sistemas abertos possuem custos menores, tanto de construção quanto de operação (BARBOZA e SERRA, 1992), motivo pelo qual são mais utilizados (AMIN, 2009). Todavia, são suscetíveis às condições meteorológicas e exigem clima propício, não possibilitando o controle adequado da iluminação, da temperatura e da taxa de evaporação da água, sendo necessária reposição deste fluido. Outros problemas são a exigência de áreas extensas de terras para o cultivo e de boa quantidade de energia para homogeneizar os nutrientes (BOROWITZKA, 1998). *Raceways* são altamente suscetíveis a contaminações por fungos, bactérias, protozoários e outros micro-organismos nocivos (RICHMOND, 2004).

Uma variação possível nos sistemas abertos básicos é a cobertura da superfície das lagoas, minimizando muitos dos problemas inerentes a este tipo de sistema (PÉREZ, 2007).

2.2.6.2 Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores são sistemas flexíveis que visam, de maneira fototrófica, fornecer iluminação às microalgas de forma solar ou artificial (ANDERSEN, 2005). Podem ser otimizados para as características fisiológicas de cada microalga selecionada, podendo ser utilizados no cultivo de variedades que não se podem obter em sistemas abertos, principalmente as mais suscetíveis, operando em regime contínuo ou em batelada. Nas Figuras 4A e 4B são vistos exemplos de fotobiorreatores.

Fotobiorreatores oferecem vantagens em relação aos sistemas abertos, possibilitando em maior grau o controle de parâmetros de crescimento da cultura de microalgas como temperatura, pH, agitação do meio e injeção de CO₂ e oxigênio. Não há demanda por grandes áreas de cultivo e há a possibilidade de maior concentração celular com mínima taxa de evaporação de água. Devido ao design fechado, esses equipamentos não permitem contato do meio de cultivo com o ambiente externo, evitando contaminações (CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010). A produtividade volumétrica é muito superior à dos *Raceways*.



FIGURA 4A – Fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas desenvolvido por GRESSLER (2011)
FONTE: BJERK, 2012



FIGURA 4B - Fotobiorreator da Saxony-Anhalt
FONTE: OLIVEIRA, 2013

Apesar de suas vantagens, o sistema de cultivo de microalgas por fotobiorreatores é mais caro que os sistemas abertos, tanto na implantação quanto na operação, e exige cuidados com possíveis problemas de superaquecimento, bioincrustação, rompimento celular por cisalhamento e acúmulo excessivo de oxigênio (CHISTI, 2007; HUANG² *et al.*, 2009).

2.3 EXTRAÇÃO DE ÓLEOS DE MICROALGAS

A extração é a etapa estratégica mais importante no desenvolvimento de processos de produção de óleos de microalgas, podendo determinar a viabilidade do processo (ADAM *et al.*, 2012; PÉREZ, 2007; TANG *et al.*, 2011).

AZEREDO (2012) fez uma estimativa dos custos de produção do biodiesel por microalgas comuns, obtendo o valor de R\$ 3,79 / litro de biodiesel gerado (isento de impostos), considerando produção em *Raceways* e fonte de carbono por CO₂ puro. Conforme referenciado por BRANDALIZE (2014), um estudo semelhante de KLEINEGRIS (2011) afirma que a produção de biodiesel a partir de microalgas só

poderia ser competitiva à produção a partir de combustíveis fósseis, na atualidade, caso o custo final fosse inferior a € 0,50 / kg processado. O valor atual chega a € 4 / kg processado. Grande parte deste custo se deve aos processos para extração e purificação do óleo após o cultivo.

Antes da extração propriamente dita, é necessário separar a biomassa do meio de cultura, geralmente utilizando-se das técnicas de pré-oxidação, coagulação, floculação, clarificação ou sedimentação, seguida de filtração granular e ozonização (HENDERSON *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2003). A seguir, a biomassa deve ser desidratada, e nessa etapa geralmente se empregam métodos como o *spray-drying*, o *sun-drying* e o *drum-drying* (MOLINA *et al.*, 2004). Por vezes se emprega a liofilização para reduzir ainda mais o risco de degradação da matéria-prima (OH *et al.*, 2010).

A técnica para extração do óleo de microalgas deve ser rápida e termolábil, a fim de reduzir a degradação de lipídeos e triacilgliceróis (MOLINA *et al.*, 1999). Além disso, o método deve ser preferencialmente aquele que proporcione a extração do óleo da biomassa celular aproveitando todo o teor lipídico existente, liberando inclusive a porção intracelular.

Os métodos mais utilizados para a extração de óleos em microalgas, e que são alvo de diversos estudos atualmente, são a prensagem mecânica, a extração com solvente, a extração com fluido supercrítico, a extração por ultrassom e o choque osmótico. Diversos trabalhos já abordaram a extração de ácidos graxos em microalgas pelo método comum de Soxhlet, bem como por técnicas de melhoria como banhos de ultrassom e outras aplicações modernas, na maioria sendo estas baseadas na ruptura da parede celular dos organismos (CHISTI, 2008).

2.3.1 Extração por solvente

A extração por solvente é o tipo mais comum e utilizado em microalgas. Há a repetição da lavagem da matéria orgânica por um solvente orgânico, podendo este método ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outras técnicas (PÉREZ, 2007).

A extração sólido-líquido presente neste caso ocorre em cinco etapas básicas: entrada de solvente pela membrana, interação com lipídeos por forças de

Van der Waals, formação de complexo, difusão do complexo na estrutura intracelular e difusão do complexo para o seio do solvente (BAHADAR E KHAN, 2013). Quanto maior é a temperatura do processo, maior é a solubilidade dos solutos e o poder penetrante do solvente, aumentando-se o rendimento de extração. A agitação e as vibrações aumentam a transferência de massa externa. Partículas menores facilitam a transferência de massa interna, tanto pela diminuição da distância até a superfície exterior, quanto pelo incremento da área de contato com o solvente (BERK, 2013).

Um solvente adequado deve solubilizar o composto de interesse sendo seletivo (MOLINA *et al.*, 1999) e ter um baixo ponto de ebulição para posteriormente ser recuperado do extrato com facilidade. Em adição, para rentabilidade do processo, o solvente deve ser barato, acessível e de preferência reutilizável. Uma desvantagem do uso de solventes é o perigo inerente à manipulação da maioria deles (PÉREZ, 2007).

Diferentes tipos de solventes apresentam diferentes propriedades e polaridades, de modo que o conteúdo lipídico majoritário a ser extraído das microalgas varia conforme apresentado na Tabela 4.

TABELA 4 – Conteúdo lipídico majoritário extraído de microalgas de acordo com o solvente

SOLVENTE	MAIORIA DOS COMPONENTES EXTRAÍDOS
Acetona	Diacilgliceróis, cerebrosídeos e sulfolípídeos
Clorofórmio	Hidrocarbonetos, carotenóides, clorofila, esteróis, triacilgliceróis, ceras, aldeídos e ácidos graxos
Hexano	Hidrocarbonetos, triacilgliceróis e ácidos graxos
Metanol e Etanol	Fosfolípídeos e glicolípídeos

FONTE: MOLINA *et al.* (1999)

A solubilidade dos óleos a serem extraídos pode ser prevista qualitativamente pela análise estrutural das moléculas que compõem a fração lipídica. Os triacilgliceróis, lipídeos apolares que envolvem forças de Van der Waals em suas ligações, podem ser extraídos por solventes apolares, como o hexano, ou de média polaridade, como o clorofórmio. Já os fosfolípídeos e os glicolípídeos são polares e envolvem ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas, sendo melhores extraídos por compostos polares (NELSON, 1991). A combinação simultânea de solventes polares e não polares, como na proporção em volume clorofórmio/metanol

2:1 do Método de Folch, pode aumentar o rendimento do processo (BAHADAR E KHAN, 2013).

2.3.1.1 Aparato de Soxhlet

O aparato de Soxhlet é um equipamento simples que possibilita a extração de uma quantidade considerável de óleo em comparação com outros métodos. O procedimento se baseia no contato contínuo da amostra com o solvente, que geralmente é operado em sua temperatura de ebulição, através do refluxo deste último por tempos prolongados.

Apesar da exigência energética para se manter o solvente em alta temperatura, o processo dispensa filtração posterior. Apresenta grande eficiência para matrizes vegetais e animais (LUQUE e GARCÍA, 1998).

2.3.1.2 Retenção de solvente e solutos pela matriz sólida

O índice de retenção de solventes e solutos é uma variável que exerce grande influência no número de estágios de contato necessários para a extração de óleos vegetais quando do projeto de extratores, impactando no volume do equipamento e em diversos outros fatores. Quando há aumento da temperatura de extração, há diminuição da retenção de solvente. Por outro lado, soluções extrato mais viscosas ocasionam maiores índices de retenção e menores taxas de extração, exigindo um maior número de estágios teóricos de extração (RODRIGUES E OLIVEIRA, 2010).

A compatibilidade entre a fase sólida e o solvente também influi no índice de retenção. RITTNER (1992) comparou a retenção do etanol azeotrópico e do hexano no processo de extração de óleo de soja. Foram retidos 0,43 kg de solução por kg de sólidos inertes quando do uso do primeiro solvente, contra 0,39 kg de solução por kg de inertes com o uso de hexano.

Muitos dos métodos usuais para cálculo do número de estágios teóricos de extração são baseados em diagramas de equilíbrio. Para a construção dos diagramas de McCabe-Thiele e de Ponchon-Savarit, é necessário o estudo da retenção de solvente e de soluto pela matriz sólida inerte, que neste caso deve ser

entendida como a massa de microalga sendo extraída, excetuando-se a umidade e os óleos totais passíveis de extração que ela carrega.

2.3.2 Outras técnicas importantes de extração

A Tabela 5 resume detalhes importantes das principais técnicas de extração de óleos de microalgas além da extração por solvente. As técnicas descritas têm aplicação mais recente na literatura.

2.3.3 Rendimentos de extração relevantes encontrados na literatura

Na Tabela 6 estão reportados os resultados experimentais mais relevantes, encontrados na literatura, para experimentos envolvendo diferentes métodos de extração de óleos de microalgas, com especial destaque para extrações em *Chlorella*.

TABELA 5 – Importantes métodos de extração em microalgas (Parte 1)

Técnica	Características	Vantagens	Desvantagens	Referências
Prensagem mecânica e homogeneização	* Aplicação de altas pressões para rompimento das paredes celulares a fim de extrair o óleo interno. * Quando aplicadas às microalgas, são capazes de extrair uma grande porcentagem (70 a 75%) dos óleos totais, e quando aliadas às extrações por solvente, são ainda mais efetivas, podendo extrair mais de 95% do óleo total disponível.	* Grande eficiência energética e econômica, pois têm grande eficácia e desprezam o uso de grande quantidade de solventes. * Minimização da contaminação da biomassa por fontes externas, mantendo a integridade química da substância originalmente interior às células.	* Diferentes métodos de ruptura celular dependem de vários fatores adicionais que implicam ou não em sua sustentabilidade, como a dureza da parede celular e a facilidade de <i>scale-up</i>.	* LEE <i>et al.</i>, 2012 * GREENWELL <i>et al.</i>, 2010 * PÉREZ, 2007 * AMARO <i>et al.</i>, 2011
Extração por fluido supercrítico	* Passou a receber maior atenção nos últimos anos por conta de sua alta seletividade e rendimento, chegando a extrair quase 100% do óleo disponível. * Os fluidos supercríticos possuem alto poder de solvatação, e aquele que é mais amplamente utilizado é o dióxido de carbono. * Normalmente se emprega também um cossolvente visando ao aumento do rendimento e/ou da seletividade da reação. Um exemplo de cossolvente é o etanol.	* O extrato obtido por esta técnica é altamente purificado e livre de resíduos de solventes. * A eficiência desse tipo de extração depende essencialmente de quatro fatores específicos: a temperatura, a pressão, a vazão de solvente e tempo de extração. * Tempos de extração menores que o método de extração por solventes.	* O processo torna-se caro devido ao custo dos equipamentos. * Devido ao custo, é inviável a extração de produtos de baixo valor agregado e/ou baixo rendimento de extração.	* ANDRICH <i>et al.</i>, 2006 * PÉREZ, 2007 * CONNEY <i>et al.</i>, 2009 * SAHENA <i>et al.</i>, 2009 * MENDES <i>et al.</i>, 1995 * MENDIOLA <i>et al.</i>, 2007 * HALIM <i>et al.</i>, 2012 * LI <i>et al.</i>, 2014
Extração enzimática	* Baseia-se na degradação da parede celular das microalgas, através de hidrólise.	* Por aumentar o rendimento de extração, a técnica oferece resultados promissores quando aliada a processos puramente mecânicos.	* Processo relativamente caro.	* FUA <i>et al.</i>, 2010 * GOMES, 2012
Choque osmótico	* Também se baseia na ruptura da parede celular das microalgas, desta vez através da redução repentina da pressão osmótica no sistema.	* Grande eficiência energética e econômica e minimização da contaminação da biomassa por fontes externas.	* Para obtenção de resultados satisfatórios faz-se necessária a inclusão de etapa posterior com uso de solvente.	* MOHEIMANI, 2005

TABELA 5 – Importantes métodos de extração em microalgas (Parte 2)

Técnica	Características	Vantagens	Desvantagens	Referências
Extração auxiliada por ultrassom	* Dentre as técnicas de extração de óleos de microalgas é aquela que gera um maior número de estudos atualmente. * O objetivo é causar a cavitação, ou seja, a criação e implosão de microbolhas de gás na fase líquida solvente, causando uma variação de pressão baseada em momentos de compressão e rarefação alternados, e a consequente ruptura da parede celular dos organismos. * Parâmetros como frequência, intensidade da irradiação, temperatura e tipo de solvente são variáveis importantes na análise.	* Possui alta eficiência, proporciona grande redução do tempo de extração e aumento de rendimento, sendo um dos métodos mais comuns para assegurar acesso livre aos solventes e a subsequente extração dos lipídeos. * A quebra celular tem por objetivo reduzir o consumo de solventes, aumentar a prevenção de contaminação, melhorar a qualidade do produto final, entre outros.	* Processo relativamente caro e ainda inviável industrialmente.	* PERNET <i>et al.</i>, 2003 * BARBOZA e SERRA 1992 * DANTAS <i>et al.</i>, 2010 * SILVA⁺, 2013 * BAUMGARDT⁺, 2013 * GOMES, 2012 * BRANDALIZE⁺, 2014 * CARDOSO <i>et al.</i>, 2014 * ORTIZ⁺⁺, 2015
Micro-ondas	* A utilização de ondas de alta frequência para o rompimento celular mostrou-se um método complementar de extração bastante eficiente em vegetais terrestres.	* LEE <i>et al.</i> (2010) compararam quatro métodos de extração mecânicos (micro-ondas, ultrassom, autoclavagem e <i>bead beater</i>) e um método não-mecânico (NaCl 10%) para culturas de <i>Botryococcus sp.</i>, <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus sp.</i> Em todos os casos, as micro-ondas foram o método mais simples, fácil e efetivo para rompimento celular das microalgas.	* Processo relativamente caro.	* LEE <i>et al.</i>, 2010
Métodos de FOLCH <i>et al.</i> (1957) e BLIGH e DYER (1959)	* Propostos essencialmente para que a qualidade da fração lipídica obtida não seja afetada. * O método de FOLCH <i>et al.</i> se baseia no uso de clorofórmio e metanol, enquanto que o método de BLIGH e DYER consiste em uma adaptação que também inclui água, formando um sistema ternário.	* Tais métodos ainda são largamente utilizados, tanto em sua forma original quanto em versões modificadas, pois são relativamente baratos e têm alta eficiência.	* Inconvenientes como a toxicidade dos solventes e a extração indesejável de contaminantes.	* FOLCH <i>et al.</i>, 1957 * BLIGH e DYER, 1959 * CHRISTIE, 1982 * HANSON e OLLEY, 1963 * NELSON, 1991 * VIÊGAS, 2010

NOTAS: (+) Membro ou ex-membro do Grupo de Pesquisa do LACTA; (++) Membro ou ex-membro do Grupo de Pesquisa do LETEX

TABELA 6 – Experimentos de extração em microalgas mais relevantes encontrados na literatura

Matéria-prima	Método	Características / Condições	Rendimento em massa	Outras informações / Conclusões	Fonte
<i>Picochlorum sp.</i>	Extração por solvente	Etanol sob agitação suave, à 26°C e pressão atmosférica local.	33,04% em relação à massa seca.	Os fatores RMV, tempo de extração e temperatura, nesta ordem, tiveram os maiores efeitos na eficiência da extração de lipídeos.	YANG <i>et al.</i> , 2014
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (CP) e <i>Chlorella powder</i>	Extração com solvente pressurizado em leito fixo e extração auxiliada por ultrassom (EAU)	* Solventes etanol (E), etanol 4% v/v em água (EA), n-hexano e metanol * Foi realizada a esterificação pelo Método de Hartman e Lago (HL) modificado para analisar as conversões dos extratos em biodiesel.	Melhores resultados: * CP, EAU, EA: 15,9% * CP, EAU, E: 15,5%	* Nos dois tipos de extração executadas, o aumento da polaridade dos solventes utilizados aumentou também a capacidade extrativa dos solventes. * Caracterização dos óleos: detectados C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:0. * Conversões para HL variando de 19,27% a 49,02% de ésteres em relação à massa inicial.	SILVA ⁺ , 2013
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extração por Soxhlet	Mistura de solventes 2:1 v/v entre clorofórmio e etanol (CE), etanol puro (E) e n-hexano (H).	* CE: 8,7% * E: 7,5% * H: 3,2%	-	BAUMGARDT ⁺ , 2013
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extração auxiliada por ultrassom (EAU) e extração por Soxhlet	* Analisou as variáveis temperatura (T), razão entre massa de microalga e volume de solvente (RMV) e potência do banho de ultrassom (PBU) para os solventes etanol (E) e hexano (H).	Melhor resultado para etanol: 14,65%. * Melhor resultado para hexano: 2,41%. * Soxhlet: E = 13,08%, H = 1,71%.	* Melhor resultado para etanol obtido em PBU = 100%, T = 30°C, RMV = 75 mg / mL. * Melhor resultado para hexano obtido com PBU = 20%, T = 60°C, RMV = 150 mg / mL.	BRANDALIZE ⁺ , 2014
<i>Chlorella sp.</i>	Extração por Soxhlet, extração auxiliada por ultrassom e por agitação magnética (EAM)	Solventes clorofórmio : metanol (2:1 v/v) do método de Bligh & Dyer, metanol, clorofórmio, etanol e hexano.	Melhores resultados: EAM utilizando clorofórmio:metanol (em média 20%), seguido de metanol (17%), clorofórmio (10,5%), etanol (7,8%) e hexano (1,15%).	A presença dos ácidos graxos 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 foi verificada por cromatografia gasosa.	VIÊGAS, 2010

NOTA: (+) Membro ou ex-membro do Grupo de Pesquisa do LACTA

2.4 EXTRAÇÃO CICLICAMENTE PRESSURIZADA (HPCE)

Baseada na extração sólido-líquido, a extração auxiliada por aplicação de ciclos de pressão hidrostática é uma técnica inovadora catalogada por DANIELE NAVIGLIO (2000). O inventor desenvolveu, inclusive, um equipamento próprio para a execução automatizada da técnica, e detém patente sobre ele. O grande diferencial desta técnica consiste na simplicidade e no baixo custo.

Segundo seu inventor, a HPCE consiste na repetida geração de gradiente de pressão negativa, através de movimentos de pistão, entre o interior e o exterior da matriz sólida sendo extraída (sendo esta fase chamada de estática) e a posterior retomada repentina das condições originais (chamada de fase dinâmica), o que induz a uma extração forçada de compostos solúveis. A fase dinâmica cria naturalmente um efeito de agitação no solvente, contribuindo para a renovação das camadas circunvizinhas às partículas e evitando a saturação dos solutos nas superfícies dos sólidos (NAVIGLIO, 2003; NAVIGLIO *et al.*, 2007; NAVIGLIO *et al.*, 2008; NAVIGLIO *et al.*, 2014). A HPCE induz à geração de um novo fenômeno de transferência, que, aliado ao fenômeno difusivo clássico, presumidamente diminuiria o tempo e aumentaria o rendimento da extração. O conjunto compressão/rarefação também é indiretamente induzido nas extrações auxiliadas por ultrassom (BRANDALIZE, 2014), e há evidências anteriores da literatura de que este fenômeno de transferência teria natureza convectiva (ORTIZ, 2015).

A HPCE merece especial destaque por não ser necessária a elevação da temperatura do solvente e ser até mesmo, segundo NAVIGLIO (2003), independente da afinidade química dos solutos pelo solvente. Ao invés disso, variáveis mais facilmente controláveis, como a pressão e a frequência de inserção dos pulsos, é que determinam a eficiência do processo (NAVIGLIO *et al.*, 2007).

A HPCE já foi capaz de reduzir o tempo e de melhorar o rendimento de extração em diversos casos registrados na literatura, conforme ilustra a Tabela 7.

Estudos envolvendo HPCE em outros casos mais específicos (BRADLEY *et al.*, 2000; OKUBARA *et al.*, 2007; SZABO *et al.*, 2010) também obtiveram resultados satisfatórios.

TABELA 7 – Alguns experimentos envolvendo HPCE já documentados (Parte 1)

Experimento	Resultados obtidos	Autor
Testes em mais de duzentas matrizes vegetais (incluindo o limoncello), exercendo aproximadamente 30 pulsos de 9 atmosferas a cada ensaio.	Conseguiu-se chegar à extração exaustiva na maioria dos testes em tempos próximos de duas horas. O estudo direcionado à produção de limoncello por extração auxiliada por HPCE, comparado à maceração, proporcionou uma redução de tempo necessário de 48 para 2 horas, chegando-se inclusive à completa exaustão das cascas de <i>Citrus limon</i> .	NAVIGLIO <i>et al.</i> , 2007
Estudo matemático da recuperação de agentes extratores do interior de partículas porosas através do efeito de pulsos de pressão pontuais nas superfícies.	A recuperação dos agentes extratores depende de constante numérica proporcional do número de poros e independente da estrutura interna desses mesmos poros. Os autores propuseram também modelos matemáticos elementares para as fases inicial e final do processo extrativo.	BABENKO <i>et al.</i> , 2005 BABENKO <i>et al.</i> , 2009
A utilização da técnica de ciclos de pressão hidrostática, através dos barociclos, já é conhecida nos meios da microbiologia e da biogenética. Foi realizado estudo utilizando ciclos entre pressão atmosférica e 235 MPa a cada três segundos.	Conseguiram extrair biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, diretamente de fragmentos de células e de tecidos vegetais, animais e de microrganismos.	TAO <i>et al.</i> , 2007 GROSS <i>et al.</i> , 2008
Extração de licopeno de resíduos da indústria do tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) utilizando água como solvente e o emprego da técnica de HPCE.	Extrato final com pureza de 98% e resultados 14% melhores que aqueles obtidos por extração comum com grandes quantidades de solventes orgânicos.	NAVIGLIO <i>et al.</i> , 2008
Comparação da extração com fluido supercrítico com a HPCE para a obtenção de alfa e beta-ácidos a partir do lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>).	Resultados satisfatórios em ambos.	FORMATO <i>et al.</i> , 2013
Investigaram a cinética de extração da matéria solúvel de folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) auxiliada por ciclos de pressão hidrostática. A influência da pressão na concentração de soluto no equilíbrio e na taxa de extração foi examinada na faixa de pressões entre 91,4 e 338,2 kPa, em 25200 segundos, com ou sem a aplicação de ciclos de pressão a 1:600 pulsos por segundo, na temperatura de $16,7 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$.	Os resultados obtidos mostraram que o aumento da pressão beneficiou tanto a taxa de extração quanto a concentração de soluto no equilíbrio. O rendimento passou de aproximadamente 13% à pressão atmosférica para cerca de 34% com a aplicação de HPCE na pressão máxima. Além disso, o tempo para se atingir a maior eficiência (que chegou a 80% no caso de maior pressão) também diminuiu. À pressão atmosférica, eram necessários aproximadamente 17000 s para que 90% da eficiência máxima fosse alcançada. À cerca de 3,4 atmosferas, a mesma eficiência foi obtida em aproximadamente 6000 s. Verificou-se ainda que a mudança no número de ciclos por segundo da HPCE para 1:1200 causou efeito desprezível tanto na taxa de extração quanto no rendimento final.	KOTOVICZ ⁺⁺ e ZANOELO ⁺⁺ , 2013

TABELA 7 - Alguns experimentos envolvendo HPCE já documentados (Parte 2)

Experimento	Resultados obtidos	Autor
Estudo da preparação de licores amargos e elixires, comparando novamente a maceração e a extração auxiliada por ciclos.	Para a HPCE, foram obtidos tempos menores e extratos de maior apreciação sensorial.	NAVIGLIO <i>et al.</i> , 2014
Investigou a influência da pressão e da HPCE sobre a cinética da extração de solutos do café torrado e moído, usando os mesmos intervalos de pressão e tempos de experimento do trabalho de KOTOVICZ e ZANOELO (2013).	O tempo necessário para alcançar o máximo rendimento foi reduzido de 25200 s, à pressão atmosférica de 91,4 kPa, para 2400 s com aplicação de ciclos de pressão a 338,2 kPa. Também foi observado um impacto positivo da pressão e da HPCE sobre o rendimento da extração no equilíbrio, que aumentou de 13% à pressão atmosférica para 28% com HPCE a 338,2 kPa, valor este que representa uma eficiência de 87%. Além de propor um modelo híbrido difusivo-convectivo para as extrações envolvendo ciclos de pressão, o referido autor concluiu que o aumento da pressão incrementa a difusividade, enquanto que os ciclos de compressão e descompressão hidrostática ocasionam um movimento de fluido através dos microcanais do sólido, gerando transferência de massa por convecção.	ORTIZ ⁺⁺ , 2015
Avaliou o efeitos da HPCE a 4 bar e a 30°C sobre o rendimento de extração de óleos da cianobactéria <i>Microcystis protocystis</i> , empregando etanol como solvente.	A HPCE a 30°C obteve eficiência de aproximadamente 56% em relação ao método de extração exaustiva empregado (Soxhlet por 12 horas e razão sólido-solvente de ~1:60).	SUREK ⁺⁺ <i>et al.</i> , 2015

NOTA: (++) Membro ou ex-membro do Grupo de Pesquisa do LETEX

Apesar do potencial promissor para seu fim, a HPCE é uma técnica recente e que ainda não encontrou suas aplicações industriais. Dado que não se encontra na literatura aplicação anterior direcionada a microalgas de nenhuma espécie, este trabalho se limitará a analisar os efeitos de uma adaptação da técnica original proposta por NAVIGLIO (2000) à extração de óleos de *Chlorella pyrenoidosa*. Busca-se reportar a influência de variáveis como a pressão e a razão entre massa de sólido e massa de solvente no equilíbrio de extração.

2.5 MODELOS MATEMÁTICOS CLÁSSICOS DE EXTRAÇÃO

Uma revisão de vários modelos matemáticos encontrados na literatura para a extração sólido-líquido é apresentada por KOTOVICZ (2014). Nos métodos empíricos ou semi-empíricos de equilíbrio, a taxa de extração pode ser proporcional

à diferença entre a concentração do soluto na fase líquida e a concentração do soluto no equilíbrio, sendo assim de primeira ordem (Equação 1). Ou ainda pode ser proporcional ao quadrado desta mesma diferença, sendo neste caso de segunda ordem (Equação 2). Para este último caso, modelos são obtidos a partir da resolução da Segunda Lei de Fick (Equação 3), de acordo com as coordenadas geométricas do sólido e requerendo condições iniciais e de contorno.

$$\frac{\partial X_l}{\partial t} = k_1(X_{le} - X_l) \quad (1)$$

$$\frac{\partial X_l}{\partial t} = k_2(X_{le} - X_l)^2 \quad (2)$$

$$\frac{\partial X_s}{\partial t} = D\left(\frac{\partial^2 X_s}{\partial r^2} + \frac{q}{r} \frac{\partial X_s}{\partial r}\right) \quad (3)$$

Aplicando o método da separação das variáveis e integrando as Equações (1) e (2), obtém-se respectivamente os modelos de extração de 1ª ordem (Equação 4) e 2ª ordem (Equação 5).

$$X_l = X_{le} - (X_{le} - X_{li}) * \exp(-k_1 t) \quad (4)$$

$$X_l = \frac{X_{le}(X_{le} - X_{li})k_2 t + X_{li}}{1 + (X_{le} - X_{li})k_2 t} \quad (5)$$

Nas equações anteriores, X_l representa a concentração de soluto na fase líquida, X_{le} é a fração mássica de soluto no equilíbrio, X_{li} é a fração mássica de soluto inicial, e k_1 e k_2 são coeficientes efetivos (taxas) de transporte de massa a serem obtidos por linearização.

2.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE DADOS

Seja um conjunto de dados J , em que diversos valores da variável y são dependentes dos respectivos valores da variável independente x . Chama-se de regressão não linear a modelagem do conjunto J através de uma função V , que é uma combinação não linear de parâmetros do modelo, e que depende de uma (x) ou mais variáveis independentes. Geralmente é empregada a minimização da soma dos quadrados dos erros existentes entre os valores dados pelo modelo e os valores reais, método este conhecido como dos Mínimos Quadrados. Em modelos não lineares, são geralmente empregados os métodos de Gauss-Newton ou de Levenberg-Marquardt. A qualidade do ajuste é usualmente expressa em termos do quadrado do coeficiente de determinação (R^2), porém a validade deste parâmetro não é garantida em todos os casos. Faz-se necessária a realização de Análise de Variância (ANOVA) para verificação da significância dos parâmetros obtidos por regressão. Valores calculados do parâmetro F de Fischer de maior magnitude resultam em p -valores menores que o p -valor significativo ($p \leq 0,1$ foi utilizado neste trabalho) em um teste de hipóteses para F . Neste caso, há indícios de que o valor de R^2 distancia-se significativamente de zero.

Cada parâmetro da função V não linear apresenta um desvio σ em relação aos dados reais. Com o valor de σ pode-se calcular a incerteza do parâmetro numa distribuição t de Student, desde que a distribuição dos dados reais possa ser representada por esta distribuição. Para o cálculo da incerteza de um parâmetro P gerado a partir de um número grande de dados, utiliza-se a Equação 6:

$$U_P = \sigma * t_{student} \quad (6)$$

Na Equação anterior, U_P é a incerteza inerente ao parâmetro P , e $t_{student}$ é um valor tabelado para diversos níveis de confiança do Teste t de Student. O teste pode ser unicaudal ou bicaudal, dependendo das condições para as quais se deseja obter para os resultados. Uma tabela do Teste t está no ANEXO I deste material, com o teste bicaudal a 90% de confiança (que foi largamente utilizado neste trabalho) em destaque. O valor estimado para o parâmetro P pode então ser expresso por $P \pm U_P$.

Quando se tem um parâmetro $Q = f(P, a, b, c, \dots)$, em que $a, b, c, \dots$ são outras variáveis quaisquer, a incerteza de Q (U_Q) pode ser calculada através da Equação 7 (HOLMAN, 2012):

$$U_Q = \left[\left(\frac{\partial Q}{\partial P} * U_P \right)^2 + \left(\frac{\partial Q}{\partial a} * U_a \right)^2 + \left(\frac{\partial Q}{\partial b} * U_b \right)^2 + \left(\frac{\partial Q}{\partial c} * U_c \right)^2 + \dots \right]^{0,5} \quad (7)$$

Se Q não é dependente de outra função além de P , a Equação 7 pode ser reduzida à Equação 8:

$$U_Q = \frac{\partial Q}{\partial P} * U_P \quad (8)$$

Para comparação da semelhança estatística entre dois valores de um parâmetro P numa análise de apenas um fator, pode ser empregada a Equação 9 (HOLMAN, 2012):

$$\Delta U_{P_1, P_2} = \sqrt{(U_1)^2 + (U_2)^2} \quad (9)$$

Na Equação 9, U_1 e U_2 são incertezas relativas aos valores P_1 e P_2 para o parâmetro P .

Se $P_1 > P_2$, calcula-se $(P_1 - \Delta U_{P_1, P_2})$. Se o valor resultante for menor que P_2 , as incertezas inerentes aos dados de P_1 e P_2 são maiores que a diferença entre eles, e então se pode afirmar que P_1 e P_2 são valores que não diferem entre si. Mas se o valor de $(P_1 - \Delta U_{P_1, P_2})$ for maior que P_2 , pode-se afirmar estatisticamente que os parâmetros P_1 e P_2 divergem de valor. A lógica de raciocínio é a mesma quando se tem $P_2 > P_1$.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, serão apresentados os materiais, reagentes, solventes e equipamentos utilizados para a realização dos experimentos necessários ao estudo proposto. Em seguida serão descritos as técnicas e os métodos laboratoriais que foram empregados neste trabalho, bem como as metodologias de cálculo utilizadas.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 *Chlorella pyrenoidosa*

As microalgas utilizadas nos experimentos foram da espécie *Chlorella pyrenoidosa*, adquiridas junto à empresa *Florien® Insumos Farmacêuticos*, em formato de embalagem de 1,0 kg (lote: 049277). Optou-se por essa microalga devido a fatores como disponibilidade e independência de sazonalidade nos cultivos, com o objetivo de manter as mesmas características e propriedades do organismo estudado em todos os experimentos realizados.

Após a etapa de peneiramento, as diferentes frações de *Chlorella* obtidas foram transferidas para recipientes independentes e identificados. Tais recipientes eram mantidos ao abrigo de calor e umidade e envoltos internamente com papel-alumínio, de forma a minimizar os efeitos oxidantes e luminosos sobre a amostra original.

3.1.2 Solventes

Foram utilizados álcool etílico *NEON®* e hexano *NEON®* de altíssima pureza como solventes experimentais. O etanol foi selecionado devido à rápida acessibilidade e aos bons resultados já descritos pela literatura para extrações variadas em *Chlorella pyrenoidosa*. Já o hexano foi escolhido devido à boa disponibilidade e ao caráter de polaridade oposto ao do etanol, permitindo

comparações futuras de resultados.

O rótulo da embalagem de hexano identifica o produto como P.A. Já o etanol é rotulado com 99,8% de pureza mínima. O etanol é um bom solvente polar, enfraquecendo ligações de hidrogênio para a obtenção de lipídeos polares, como os fosfolipídeos e os glicolipídeos. Porém não é um solvente seletivo, extraíndo também contaminantes como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos não desejáveis (SILVA, 2013). Ainda assim, MOLINA *et al.* (2004) apontam o etanol como melhor solvente para extração de óleos de microalgas.

3.1.3 Peneira automática

Para o peneiramento inicial da *Chlorella pyrenoidosa* bruta foi utilizado o agitador automático de peneiras da Bertel[®] Indústria Metalúrgica, do tipo magnético, série 8706. Durante o peneiramento foram usadas cinco peneiras com diferentes aberturas Tyler/Mesh (35, 80, 100, 150 e 200) conforme disponibilidade, além de uma panela de fundo para coleta dos finos, todos da marca Bertel[®].

3.1.4 Estufas de secagem

Nos experimentos de secagem, além de placas de Petri comuns, utilizou-se uma estufa a vácuo Ethik[®] Technology 440-1D importada pela Labstore[®] Equipamentos para Laboratório LTDA, regulada para fornecer vácuo de -500 mmHg. Nos experimentos subsequentes, devido à maior acessibilidade, foi utilizada uma estufa comum com recirculação de ar e controle PID de temperatura do mesmo fabricante Ethik[®] Technology 400-2ND (com calibração segundo a NBR/ISO IEC 17025, sob identificação NG-10312).

3.1.5 Dessecador

Para a pós-secagem dos balões, béqueres e *ependorfs* após a estufa, foram utilizados dessecadores de vidro simples.

3.1.6 Aparato de Soxhlet

Nos experimentos de extração exaustiva foram utilizados dois aparatos de Soxhlet de vidro comum a serem detalhados abaixo:

- Dois balões volumétricos de fundo chato *Phox*[®] de 250 mL de capacidade;
- Duas chapas de aquecimento elétrico IKA[®] C-MAG HS 4;
- Duas câmaras de extração Soxhlet de 250 mL;
- Dois condensadores superiores de Soxhlet;
- Quatro mangueiras genéricas de borracha (para condensador superior de Soxhlet);
- Água corrente à temperatura ambiente para efetuar a condensação.

Ao final da extração exaustiva utilizou-se um rotaevaporador IKA[®] RV10, anexado à bomba de vácuo *Quimis*[®] Q355B, para vaporização do solvente dos balões volumétricos.

3.1.7 Sachês de microalga

Em experimentos como as extrações por Soxhlet, as extrações à pressão constante e as extrações com aplicação de ciclos de pressão, foi necessária a utilização de sachês de microalga. Cada sachê envolvia certa massa da matéria-prima, aferida previamente em balança, em um papel-filtro do fabricante *Qualy*[®], com espessura de 205 µm e maioria dos poros com 14 µm. Esta última medida é muito inferior ao diâmetro médio da fração de *Chlorella* selecionada, previamente encontrado no experimento de peneiramento. O papel era formatado e grampeado de forma a impedir que a matriz sólida original se encontrasse em leito livre com o solvente, possibilitando simplificações de cálculo posteriores.

3.1.8 Béqueres, pipetas, erlenmeyers e balões volumétricos

Nos experimentos envolvendo as câmaras de extração (Item 3.1.9), utilizaram-se 28 béqueres, de 50 mL cada, para armazenamento e posterior secagem em estufa das amostras de óleo extraído. Erlenmeyers de diversas capacidades foram utilizados especialmente nos experimentos de caracterização

dos óleos extraídos, assim como balões volumétricos de 25, 50, 100 e 250 mL.

3.1.9 Recipientes de polietileno

Seringas em formato “*Luer Lock*” da marca *Advantive*[®], de 60 mL cada uma, tiveram seu bico injetor inferior fundido através de clava metálica aquecida, de forma a vedar esta superfície após a secagem do polietileno. Isso tornou esses recipientes aptos a serem utilizados como *câmaras* de extração de *pressão variável* quando o êmbolo superior sofria movimentação. A cada experimento um conjunto de sete câmaras foi utilizado simultaneamente.

A cada sete experimentos, o conjunto de recipientes de polietileno foi trocado, buscando manter o padrão de compressão e descompressão dos êmbolos, que, devido ao contato das partes poliméricas com os óleos e solventes, poderia ter suas propriedades alteradas.

Também foi frequentemente utilizado um suporte de isopor encaixado dentro do banho ultratermostático (Item 3.1.10), com sete furos de diâmetro pouco maior que aquele das câmaras de extração, e que serviu para manter os recipientes na posição vertical.

Nos casos em que os recipientes ficavam sujeitos à pressão atmosférica (êmbolos apenas ligados às câmaras), béqueres eram colocados sobre os êmbolos, para garantir que toda a amostra de solvente e de sachê estava submersa ao banho ultratermostático. Como o etanol tem densidade menor que a água à pressão atmosférica, e as câmaras de extração também possuem dentro delas ar atmosférico, parte do solvente contido nos recipientes de polietileno tenderia a ficar sem contato com a água do banho ultratermostático devido ao empuxo.

3.1.10 Banho ultratermostático

Foi utilizado banho ultratermostático *Solab*[®] SL 152/10, com precisão de $\pm 0,5$ °C, para manter a temperatura dos solventes de extração constante através de aquecimento indireto por água destilada.

3.1.11 Prensa hidráulica e suporte para compressão

Para manter as pressões constantes durante a fase de compressão das câmaras de extração, foi empregado um suporte metálico, em formato tetraédrico, com chapa superior de altura variável, podendo esta ser regulada por ajuste de parafusos. Para as pressões de 400 kPa e 600 kPa, difíceis de se obter manualmente nas câmaras devido à contrapressão surgida nesses casos, empregou-se uma prensa hidráulica de alavanca, capaz de regular a altura da chapa do suporte para compressão.

3.1.12 Balança analítica

Foi utilizada na aferição de massas uma balança analítica *Gehaka*® AG200 que possui, segundo especificação do fabricante, divisão de medição de 0,0001 g, repetitividade de $\pm 0,0002$ g e linearidade de $\pm 0,0003$ g.

3.1.13 Termopar

Para aferir a temperatura da água destilada do banho ultratermostático com precisão foi utilizado um termopar digital *Instrutherm*® TH-060 tipo K previamente calibrado.

3.1.14 Cronômetro

Para aferir o tempo decorrido durante os experimentos utilizou-se cronômetro simples modelo *CronoBio*® SW2018.

3.1.15 Reagentes para reações de caracterização

Nos experimentos de caracterização da *Chlorella pyrenoidosa* e de seus óleos extraídos, foram utilizados os seguintes solventes e reagentes de laboratório:

- Água destilada;

- Água deionizada;
- Hidróxido de sódio em micropérolas *Vetec*[®], com PM = 40,0 e pureza mínima de 99% ;
- Metanol *Sigma-Aldrich* com PM = 32,04 e pureza HPLC $\geq 99,9\%$;
- Cloreto de amônio *Vetec*[®] com PM = 53,49 e pureza mínima 99,5%;
- Ácido sulfúrico *Vetec*[®] com PM = 98,08 e pureza 95 – 99%;
- Heptano *NEON*[®] P.A. com PM = 100,20;
- Óxido de zinco *Carlo Erba* RPE P.A.;
- Ácido nítrico *NEON*[®] com PM = 63,01 e pureza mínima 65%;
- Ácido clorídrico *Vetec*[®] com PM = 36,46 e pureza mínima 37%;
- Hidróxido de potássio em lentilhas *Anidrol*[®] com PM = 56,11 e pureza mínima de 85%;
- Sulfato de hidrazina *NEON*[®] com PM = 130,12 e pureza mínima de 99%;
- Molibdato de sódio *Vetec*[®] com PM = 241,95 e pureza mínima de 99,5%;
- Hidrogeno fosfato de potássio *Nuclear*[®], com PM = 136,09 e pureza mínima de 98%, pré-aquecido a 101°C por 2 h;
- Biftalato de potássio *Vetec*[®], com PM = 204,22 e pureza mínima de 99,5%, pré-aquecido a 120°C por 2 h;
- Solução 1% de fenolftaleína *Vetec*[®] P.A. com PM = 318,33;
- Acetona *NEON*[®] com PM = 58,08 e pureza $\geq 99,5\%$;
- Ácido oxálico anidro *NEON*[®] com PM = 90,03 e pureza mínima de 99%.

3.1.16 Centrífuga

Para acelerar a separação das fases polar e apolar ao final do Método de Hartman-Lago, foi utilizada centrífuga *Excelsa*[®] II modelo 206 BL, fabricada pela Fanem (São Paulo - SP).

3.1.17 Tubos de ensaio e cápsulas de centrifugação

Durante os experimentos de caracterização, tubos de ensaio de vidro de tamanhos variados foram utilizados, tanto na forma destampada quanto com tampas rosqueáveis protegidas por borracha. Nas centrifugações dos experimentos de

Hartman-Lago para separação das fases, foram utilizados recipientes tampados próprios para esta aplicação, que suportam as forças centrípeta e centrífuga existentes a 5000 RPM.

3.1.18 Pipeta mecânica

Em diversos experimentos de caracterização foram utilizadas as micropipetas *MDI[®] Premium* semiautoclavável (1,0 a 5,0 mL) e *Brand[®] Transferpette S Digital* (100 a 1000 µL) juntamente a pontas de pipetagem adequadas.

3.1.19 Eppendorfs

Foram utilizados *eppendorfs* plásticos *MCT-200-C* de 2 mL com fundo chato, fabricados pela *Axygen[®] Scientific*, para avaliação das diferenças entre as massas final e inicial nos métodos de caracterização. As amostras eram guardadas em geladeira de laboratório para aumentar a vida útil dos óleos.

3.1.20 Cadinhos, vidros-relógio e forno mufla

Cadinhos cerâmicos, vidros-relógio compatíveis e forno mufla modelo *Eletro Therm[®] CC405* foram utilizados nos experimentos de determinação de cinzas e de estimativa do teor de fósforo.

3.1.21 Espectrofotômetro

Para os experimentos de determinação de teores de fósforo e de teores de clorofilas, foi utilizado espectrofotômetro *Pró-Análise[®] UV-1100*, com 4 cubetas de prova de quartzo compatíveis.

3.1.22 Titulador automático

Nas titulações do experimento de determinação do teor de acidez foi utilizado titulador automático *Brand® Titrette Classe A* para 50 mL.

3.2 MÉTODOS

Após definição sistemática da sequência de experimentos, e da calibração dos sensores, os experimentos foram executados conforme descrito a seguir.

3.2.1 Peneiramento das microalgas

O peneiramento da amostra completa de *Chlorella pyrenoidosa* através de peneira automática (Item 3.1.3) teve o objetivo de determinar a granulometria da amostra para seleção da melhor fração de microalga a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Com o agitador automático já operando, a amostra foi dosada cuidadosamente sobre a peneira superior de 35 mesh durante 5 minutos. Depois que a adição terminou, o equipamento foi mantido em operação por mais 30 minutos em potência máxima de agitação, como é visto na Figura 5. Ao final, as amostras de cada peneira foram transferidas para recipientes vedados com papel-alumínio e guardadas para posterior utilização.



FIGURA 5 – Peneiramento das microalgas *Chlorella pyrenoidosa*

3.2.2 Testes de secagem

Amostras de um grama de microalga foram adicionadas por haste dosadora a placas de Petri de massa previamente aferida. Uma triplicata foi adicionada à estufa a vácuo da marca *Ethik*[®], em que foi parametrizado vácuo de -500 mmHg e temperatura de secagem de 60°C por 24 horas. Posteriormente os conjuntos foram transferidos para dessecador, no qual ficaram por 30 minutos para diminuição da temperatura com mínima retomada de umidade, e depois disso tiveram suas massas aferidas. As amostras secas de microalga foram, então, descartadas.

A umidade em base úmida para cada amostra pode ser calculada através da Equação 10:

$$U_{b.u.} = \frac{m_{as} - m_{ps}}{m_m} \quad (10)$$

Na Equação anterior, m_{as} refere-se à massa do conjunto placa de Petri e microalga antes da secagem; m_{ps} refere-se à massa do mesmo conjunto após a secagem; e m_m indica a massa de microalga bruta inicial do teste. Para a determinação da umidade em base seca, procede-se ao cálculo indicado pela Equação 11:

$$U_{b.s.} = \frac{m_{as} - m_{ps}}{[m_m - (m_{as} - m_{ps})]} \quad (11)$$

3.2.3 Experimentos de extração exaustiva por Soxhlet

Para determinar a quantidade de óleos experimentalmente possível de ser extraída da *Chlorella pyrenoidosa*, foram necessários ensaios exaustivos. Foi selecionado o Método de Soxhlet pela simplicidade e pela disponibilidade de aparato.

Em cada experimento, um sachê de papel-filtro ganhou forma através de recorte e teve o peso tarado. Posteriormente a massa de 3,5 gramas de microalga foi adicionada e o sachê foi fechado por grampos simples, sendo novamente aferido em massa. 200 mL de álcool etílico da marca NEON[®] (no 1º experimento), ou 200 mL de hexano NEON[®] (no 2º experimento) foram adicionados a balões

volumétricos (previamente tarados) através de bureta. A razão entre os valores de volume de solvente e massa de microalga ficou em 57,14 vezes, um valor significativo, para que não se corresse o risco de saturação dos solventes durante a extração exaustiva.

Uma vez que as chapas de aquecimento não são isoladas como as mantas de aquecimento, há grande dissipação de calor para o ambiente. Devido a isso, as chapas utilizadas tiveram de ser programadas para fornecer aproximadamente 360°C (nos experimentos com etanol) e 300°C (nos experimentos com hexano) em sua superfície, para que o solvente, interno ao balão, ficasse em sua temperatura de ebulição durante a corrida experimental.

Com cada sachê inserido na câmara de extração e as chapas de aquecimento ligadas, o experimento foi iniciado e mantido por 12 horas, tempo antes já utilizado por BRANDALIZE (2014) em experimento similar. Foram conduzidos um ensaio em triplicata para o etanol e um ensaio em duplicata para o hexano, conforme é visto na Figura 6.

Após a fase de extração, cada balão volumétrico foi colocado em rotaevaporação, sendo exposto à rotação de 50 RPM e a 50°C durante 30 minutos para remoção do solvente. Posteriormente os balões foram deixados em estufa simples a 55°C por 24 horas para perda do solvente residual, e depois suas massas foram novamente aferidas.

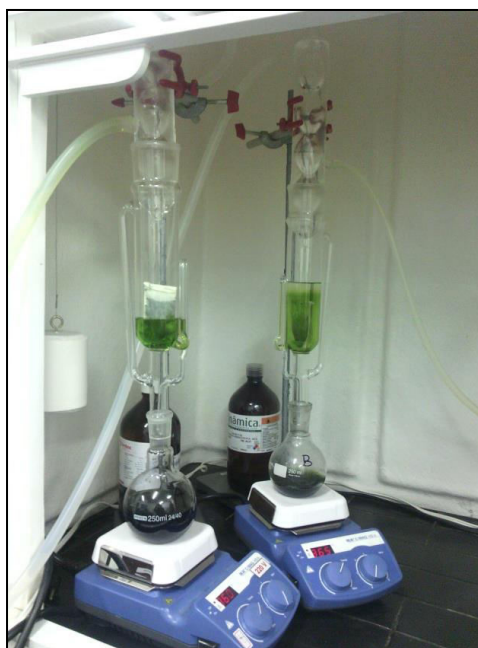


FIGURA 6 – Experimento de Soxhlet com hexano para a microalga *Chlorella pyrenoidosa*

O rendimento em óleo, em base seca, obtido nos experimentos de extração exaustiva por Soxhlet pode ser calculado através da Equação 12:

$$\eta = \frac{m_{af} - m_{ai}}{m_m(1 - U_{b.u.})} \quad (12)$$

Na equação anterior, m_{af} indica a massa do conjunto balão volumétrico mais óleo extraído depois da secagem em estufa, m_{ai} é massa do balão vazio, e m_m é a massa de microalga presente no sachê de extração.

3.2.4 Estimativas da densidade real do etanol e de parâmetros como temperatura e RMM's dos experimentos

A densidade do etanol P.A. utilizado nos experimentos foi estimada através de medições de massa em balões volumétricos nos quais volumes fixos de amostra foram adicionados. Neste caso foi utilizada a balança semianalítica do Laboratório CEPPA.

A única temperatura experimental empregada na avaliação dos efeitos da HPCE, 30°C, foi selecionada através dos resultados obtidos por BRANDALIZE (2014) em seus trabalhos com a mesma espécie de *Chlorella* estudada. O referido autor analisou, entre outros parâmetros, a influência de três temperaturas no rendimento da extração para esta microalga, encontrando o valor de 30°C no experimento de melhor resultado. Como no presente trabalho, a princípio, não se pretende analisar o efeito da temperatura, o valor ótimo de BRANDALIZE para esta variável foi fixado. A pressão de vapor excessiva do etanol em temperaturas maiores também poderia causar fraturas nas câmaras de extração dos experimentos a serem detalhados nos Itens 3.2.5 e 3.2.6.

O cálculo das frações sachê / solvente a serem empregadas nos experimentos subsequentes também levou em conta os dados obtidos por BRANDALIZE (2014) em seus trabalhos. A razão massa-volume (RMV) ótima obtida pelo referido autor em seus testes foi convertida e usada neste trabalho como RMM (razão massa-massa) experimental inicial. A partir dela foram propostas, a partir de adições e subtrações constantes em massa, outras RMM's a serem utilizadas. A Tabela 8 explicita quais são estes valores.

TABELA 8 – Valores definidos para as massas de *Chlorella pyrenoidosa* internas aos sachês

Volume de etanol na extração (mL)	RMV (g Microalga / mL Solvente)	RMM (g microalga / g solvente etanol)	Massa de microalga em cada sachê (g)
30	0,033	0,043	1,00
30	0,075 (RMV ótima de BRANDALIZE)	0,096	2,25
30	0,117	0,149	3,50
30	0,158	0,202	4,75
30	0,200	0,255	6,00

3.2.5 Experimentos de extração à pressão atmosférica em *Chlorella pyrenoidosa*

Foi definido que o volume fixo de 30 mL de etanol NEON® seria utilizado em cada uma das câmaras de extração durante todos os experimentos. Ensaio preliminares com tempos de uma e três horas de duração, nos mesmos moldes a serem detalhados a seguir, mostraram que o equilíbrio de extração estava ainda distante, uma vez que a curva de rendimento de extração estava em clara ascendente, e não numa assíntota, como se apresentaria em caso de equilíbrio. Fixou-se então o tempo máximo de sete horas por experimento, para o qual se obteve resultados satisfatórios.

O experimento básico à pressão atmosférica constante consistia no método detalhado a seguir:

- A) Medir na balança analítica as massas de cada um dos 28 béqueres vazios, anteriormente lavados, secos em estufa e mantidos em dessecador por 30 minutos para manutenção do padrão experimental;
- B) Tarar a massa de uma das sete câmaras de extração na balança, e com auxílio de um pisquete adicionar aproximadamente 23,49 gramas (que totalizam 30 mL a partir da densidade calculada para o etanol anidro), lançando mão de um conta-gotas se necessário. Fechar levemente a câmara de extração com o êmbolo superior e repetir este procedimento para as outras seis câmaras;

- C) Recortar sachê de papel-filtro de tamanho predeterminado, e adicionar em seu interior uma massa de microalga, próxima à designada, através de haste dosadora. Ao final, fechar o sachê com grampos simples e repetir exatamente o mesmo procedimento para seis outros sachês;
- D) Ligar o banho ultratermostático, já com água destilada em seu interior, ajustar a temperatura deste equipamento para 30°C e aferir esta grandeza regularmente para verificação de sua estabilização;
- E) Colocar cada sachê, já numerado de 1 a 7, no interior de cada câmara de extração, também já numeradas de 1 a 7. Encaixar o êmbolo levemente nas câmaras, procurando não exercer pressão extra (tampando apenas para evitar a perda de solvente por vaporização). Colocar as câmaras dentro do banho ultratermostático, utilizando o suporte de isopor perfurado para encaixá-las, deixando-as posicionadas na vertical. Dar início à contagem experimental no cronômetro;
- F) A cada 20 minutos decorridos faz-se necessária a tomada de amostra em uma das câmaras de extração. Sabe-se que a variação na quantidade de solvente altera o gradiente de extração e, portanto, deve-se tomar uma amostra de valor mínimo para a menor perturbação possível nas condições iniciais do sistema. Foi definido então que as amostras teriam apenas 1,5 mL cada. A câmara da qual será retirada a amostra deve ser sacada e deve ser levemente agitada, para que a concentração dos óleos extraídos até aquele momento se homogeneíze. O padrão de agitação deverá ser repetido em todos os outros experimentos com as câmaras de extração, sejam eles à pressão atmosférica, à outra pressão constante ou com a inserção de ciclos de pressão. Na retirada de amostra, o êmbolo deve ser removido, e, com auxílio de pipeta volumétrica com pêra de sucção, deve-se cuidadosamente aferir 1,5 mL e o adicionar a algum dos 28 béqueres previamente aferidos em massa. Encaixa-se novamente o êmbolo na câmara e esta é devolvida a seu lugar original no banho ultratermostático. O béquer contendo a amostra pipetada deve ser rapidamente aferido em massa, e depois deve ser colocado em estufa a 55°C para perda do solvente. Deve-se efetuar lavagem rápida da pipeta em etanol puro ou semipuro para que não se carregue vestígios de óleo extraído entre uma amostra experimental e outra;

- G) Repete-se duas vezes o passo anterior na câmara de extração 1. Quando o cronômetro marcar 60 minutos, deve-se tomar as duas amostras finais da câmara 1. A numeração de cada câmara de extração corresponde ao tempo em que esta deverá ficar em regime experimental. Por exemplo, a câmara 1 deverá ser retirada do experimento após uma hora, a câmara 2 depois de duas horas, e assim sucessivamente. As amostras finais não implicam em variação posterior na proporção sólido-solvente interna à câmara, e, portanto, são maiores: são coletadas duplicatas de 5,0 mL cada, utilizando-se dois béqueres para tal. Importante notar que a aferição da massa das amostras em balança deve ser rápida, pois do contrário perde-se solvente naturalmente e a amostra sofre concentração significativa, levando a erro experimental;
- H) Após a execução do passo anterior, a câmara de extração 1 deve ter seu sachê descartado e deve ser lavada. Amostras de 80 e 100 minutos experimentais (1,5 mL) são tomadas então da câmara 2, e aos 120 minutos toma-se uma duplicata (5,0 mL) deste mesmo recipiente, descartando-o logo a seguir. Passa-se então para a terceira câmara, e assim sucessivamente, até a retirada da sétima câmara ao final do experimento, quando já deverão existir 28 béqueres na estufa de secagem. O motivo de serem utilizadas exatamente sete câmaras de extração deve-se à correspondência perfeita com o tempo (uma câmara é retirada exatamente a cada hora) e a limitação do volume de solvente interno de cada uma delas (30 mL). Caso se utilizasse de câmaras de extração maiores (e com sachês internos maiores), ou se as retiradas de amostra pela pipeta envolvessem volumes ainda menores, uma mesma câmara de extração poderia ser utilizada por ainda mais tempo.
- I) Ao final, os equipamentos devem ser desligados, exceto a estufa, que deverá ser mantida ligada por 24 horas. Após este período, deve-se novamente medir a massa dos 28 béqueres (agora preenchidos de massa oleosa seca, como no exemplo da Figura 7) e então se calcular o rendimento obtido para cada um dos tempos experimentais.

Este experimento foi repetido para as quatro RMM's propostas, sempre usando a temperatura fixa de 30°C.



FIGURA 7 – Béqueres, com massa oleosa extraída, após 24 horas de secagem em estufa

3.2.6 Experimentos de extração com aplicação de ciclos de pressão hidrostática em *Chlorella pyrenoidosa*

Foi estipulado que as pressões de 200 kPa, 400 kPa e 600 kPa seriam aplicadas às câmaras de extração em ciclos de pressão e descompressão. Pressões superiores a 600 kPa não são possíveis nestes experimentos devido à fragilidade das câmaras, sujeitas neste caso a rachaduras, quebras de êmbolo, etc.

Os ensaios de extração com a aplicação de HPCE envolvem passos adicionais não presentes nos ensaios à pressão atmosférica. Neste tipo de teste, os passos A, B, C e D do Item 3.2.5 são basicamente repetidos. É a partir do passo E, detalhado abaixo, que a rotina experimental muda:

- E) Para o experimento com ciclos de pressão, deve-se sempre realizar um teste preliminar com uma câmara de extração e um sachê de microalga. Insere-se o sachê dentro do recipiente e engata-se o êmbolo levemente, assim como nos experimentos à pressão atmosférica. Mede-se com uma régua a diferença (em centímetros) entre o nível do solvente interno e a altura da parte inferior do êmbolo. Essa distância será utilizada para um cálculo subsequente que se utiliza da Lei de Boyle, mostrada na Equação 13:

$$P_1 * V_1 = P_2 * V_2 \quad (13)$$

Segundo a Lei de Boyle, o volume interno de ar atmosférico V_1 presente na câmara de extração exerce pressão determinada sobre o solvente, expressa por P_1 . Quando o êmbolo está apenas engatado levemente, não se exerce pressão significativa, e assume-se que o volume ocupado pelo ar no interior do recipiente (V_1) não sofre compressão alguma quando comparado ao ar ambiente (V_2). Portanto, neste caso, a pressão P_1 é semelhante à pressão P_2 externa, tomada como 91,4 kPa no local dos testes.

Quando se pretende exercer alguma pressão absoluta dentro da câmara de extração, deve-se pressionar o êmbolo até certa altura. Simplificando a Lei de Boyle:

$$P_1 * A_1 * h_1 = P_2 * A_2 * h_2 \quad (14)$$

Como a área da secção transversal da câmara de extração é constante:

$$P_1 * h_1 = P_2 * h_2 \quad (15)$$

Na Equação 15, P_2 é a pressão atmosférica, h_2 é a diferença de alturas (em cm) entre o nível do solvente e do êmbolo quando não se exerce pressão, e h_1 é a diferença de alturas quando se exerce determinada pressão. Sendo P_1 maior, h_1 irá diminuir, e o êmbolo deverá ser pressionado até que se verifique h_1 .

Esse teste inicial foi repetido para cada uma das diferentes massas de sachê, uma vez que a altura do nível de volume da combinação sachê mais solvente se altera para cada caso.

F) Sabendo-se a posição até a qual cada êmbolo deverá ser pressionado, tomam-se as seringas 1, 2, 3 e 7 e nelas se insere seus respectivos sachês de *Chlorella*. Rapidamente, comprimem-se as seringas e estas são colocadas no suporte metálico de compressão. A pressão de 200 kPa foi obtida manualmente nos êmbolos, enquanto que os testes nas pressões de 400 kPa e 600 kPa exigiram a utilização de prensa hidráulica. A Figura 8, retirada de ORTIZ (2015), ilustra esta etapa. O

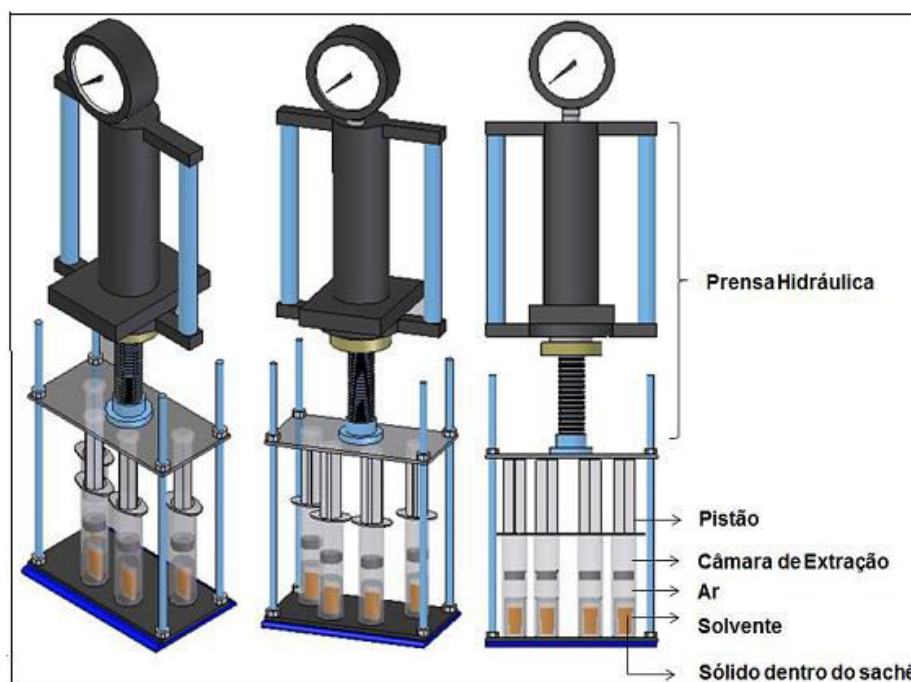


FIGURA 8 – Fase de compressão do conjunto de câmaras de extração auxiliada por prensa hidráulica

FONTE: ORTÍZ, 2015

conjunto das quatro câmaras de compressão, mais o suporte, é inserido dentro do banho ultratermostático com temperatura já aferida. Neste momento se dá o início da contagem no cronômetro.

- G) De acordo com a taxa de compressão e descompressão, é necessário modificar o estado das câmaras em determinados tempos. A taxa de 1:600 expressa que a cada 600 segundos há um ciclo de compressão e de descompressão. Como habitualmente tomam-se tempos iguais para cada caso, são 300 segundos de compressão e 300 de descompressão à pressão atmosférica. Neste trabalho foi utilizada apenas esta taxa, pois ela gerou bons resultados nos trabalhos de KOTOVICZ E ZANOELO (2013) e de ORTIZ (2015), e a variação deste parâmetro não foi um dos objetivos estipulados.
- H) Executando o que foi descrito no passo (G), depois de 300 segundos (5 minutos) as câmaras são removidas do banho e do suporte de compressão, voltando individualmente para as posições do suporte de isopor. A própria descompressão brusca já eleva os êmbolos até o nível em que se considera haver apenas engate entre este e a câmara, ou seja, pressão atmosférica interna. Manter as câmaras com os êmbolos

engatados é importante para que não haja perda de solvente, sobretudo neste caso de descompressão, uma vez que esta operação termodinâmica transfere boa quantidade do solvente interno para o estado de vapor.

- I) Após outros 300 segundos, as seringas foram novamente comprimidas com auxílio do suporte metálico de compressão (e da prensa hidráulica quando necessário). Essa dinâmica de ciclos foi repetida durante as sete horas de cada experimento. Procurou-se repetir um mesmo padrão de agitação das câmaras em todas as operações de compressão e descompressão.
- J) Tomadas de amostra semelhantes às detalhadas nos passos F, G e H do Item 3.2.5 são realizadas. Tais amostras são sempre obtidas após períodos de descompressão, e logo após qualquer amostragem as seringas voltam ao estágio de compressão.
- K) Depois de uma hora de experimento, descartou-se a câmara de extração 1 e foi inserida a câmara 6 no ensaio. Depois de duas horas, retirou-se a câmara 2 e foi adicionada a 5. E depois de 3 horas a câmara 3 foi sacada para dar lugar à câmara 4. Este arranjo, detalhado no diagrama da Figura 9, foi adotado devido à dificuldade de se inserir sete câmaras de extração simultaneamente no suporte de compressão.

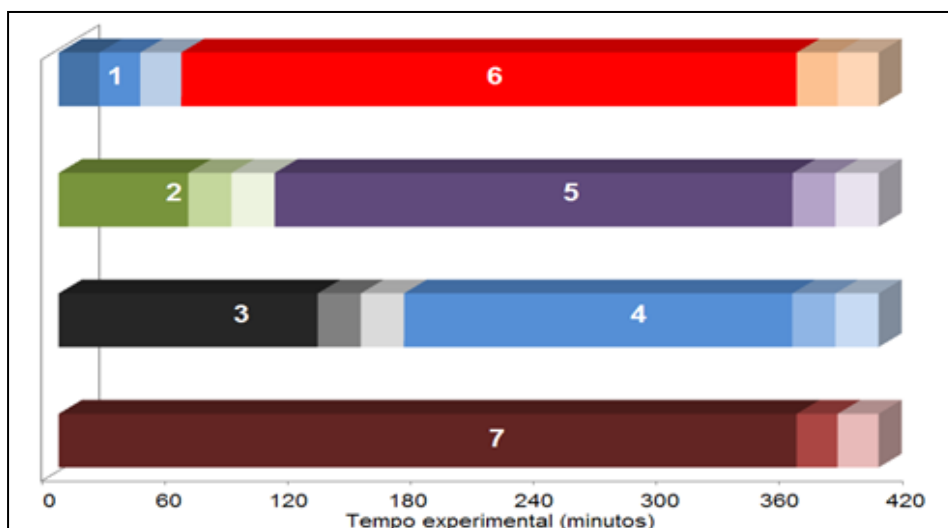


FIGURA 9 – Arranjo experimental para ensaios de extração com ciclos de pressão e descompressão (as mudanças de tonalidade nas colorações das barras indicam os tempos de tomada de amostra, e as mudanças de cor indicam as trocas das respectivas câmaras de extração no banho ultratermostático)

A última hora do experimento, seguindo-se o arranjo da Figura 9, sempre exige cuidado especial, já que em um mesmo tempo são requeridas quatro tomadas de amostra a serem feitas individualmente. E ao se completarem sete horas, são colhidas quatro duplicatas.

- L) Semelhante ao que aconteceu nos ensaios à pressão atmosférica, os 28 béqueres foram deixados em estufa simples por 24 h e após este tempo tiveram a massa aferida.

Para os experimentos de extração à pressão atmosférica e de extração auxiliada por ciclos de pressão, a porcentagem mássica de óleo (X_l) presente em cada amostra pode ser calculada pela Equação 16:

$$X_l = \frac{(M_{bf} - M_{bi})}{(M_{b+a} - M_{bi})} \quad (16)$$

Na Equação anterior, M_{bf} expressa a massa do conjunto béquer mais óleo extraído após secagem em estufa, M_{bi} é a massa do béquer vazio, e M_{b+a} é a massa do conjunto amostra pipetada mais massa original do béquer correspondente. Para o cálculo do rendimento da extração, emprega-se a Equação 17:

$$\mu = \frac{100 M_s \left(\frac{X_l}{1 - X_l} \right)}{(1 - U_{b.u.}) M_m} \quad (17)$$

Na Equação 17, M_s é a massa de solvente interna à câmara de extração, $U_{b.u.}$ é o teor de umidade em base úmida da microalga original (determinado nos testes de secagem) e M_m é a massa de microalga em cada sachê de extração.

3.2.7 Experimento de avaliação da retenção de solvente e solutos por inertes

Dez sachês de papel-filtro vazios tiveram suas massas aferidas. Depois,

massas de *Chlorella pyrenoidosa* de 1,00 g, 2,25 g, 3,50 g, 4,75 g e 6,00 g foram adicionadas a eles em duplicata. Foi realizada, usando esses sachês, a extração à pressão atmosférica e a 30°C, de óleos de *Chlorella* com 23,49 g de solvente etanol NEON® em cada câmara de extração. A extração durou 12 horas, com o objetivo de avaliar a penetração e retenção do solvente nas partes sólidas dos sachês, bem como a retenção dos solutos nessa fase inerte. Neste experimento não se utilizaram ciclos de HPCE, pois não se pretendeu avaliar o rendimento final em óleos extraídos.

Depois do tempo total, os sachês foram removidos das câmaras de extração com pinças e, após gotejamento inicial de 120 segundos, suas massas úmidas foram aferidas em balança. Após serem colocados em estufa por 24 horas a 60°C, os sachês de microalga (agora secos) foram novamente aferidos em massa.

Durante o mesmo tempo de 12 horas, três sachês de papel-filtro vazios foram colocados nas mesmas condições das outras câmaras de extração, com o objetivo de avaliar a retenção de solvente apenas no papel. Suas massas úmidas foram também aferidas.

A massa de solvente retida pela microalga interna a cada sachê pode ser calculada segundo a Equação 18:

$$M_{solvente_retido} = m_{su} - m_{ss} - m_{sv} * L_1 \quad (18)$$

Na Equação anterior, m_{su} indica a massa aferida para o sachê úmido (logo após a extração), m_{ss} é a massa do sachê seco (após secagem em estufa), m_{sv} é a massa do sachê vazio inicial e L_1 é a massa estimada de solvente retido por massa de papel-filtro seco m_{sv} . Em resumo, a Equação 18 calcula o quanto de solvente foi retido apenas pela microalga, descontando da massa do conjunto úmido a massa seca e também a massa de solvente que o papel-filtro reteve no experimento. O valor de L_1 é obtido através dos sachês que passaram pelas câmaras de extração sem portar massas de *Chlorella*.

A massa de inertes presentes em cada sachê foi estimada segundo a Equação 19:

$$M_{inertes} = m_m * (1 - U_{b.u.}) * (1 - \eta) \quad (19)$$

Na Equação 19, m_m indica a massa apenas de *Chlorella* alimentada em cada sachê. $U_{b.u.}$ vem a ser a umidade em base úmida da amostra. E η , admitindo o experimento pelo método de Soxhlet como extração exaustiva de óleos, indica a fração mássica inicial de óleos na microalga seca. η será tomado do ensaio que utilizou etanol como solvente. $M_{inertes}$ indica, resumidamente, toda a massa restante após se descontar, de uma determinada massa de *Chlorella*, a umidade e os óleos extraíveis totais presentes.

Para o cálculo da retenção de solvente pelos inertes (M), procede-se com o cálculo proposto na Equação 20:

$$M = M_{solvente_retido} / M_{inertes} \quad (20)$$

3.2.7.1 Os diagramas de McCabe-Thiele e Ponchon-Savarit

Através de um balanço de massa para os óleos totais extraíveis, torna-se possível o cálculo da massa de lipídeos extraíveis que permaneceu na microalga mesmo após a extração (M_a), dada pela Equação 21:

$$M_a = m_m * (1 - U_{b.u.}) * \eta_{b.s.} - [M_s - M_{solvente_retido}] * \left[\frac{X_{le}}{1 - X_{le}} \right] \quad (21)$$

Na Equação anterior, M_s indica a massa de solvente total adicionada em cada câmara de extração e X_{le} é a fração mássica, no equilíbrio, de lipídeos na solução extraída, sendo este parâmetro estimado por linearização através da Equação 4. Basicamente, M_a desconta da quantidade total de lipídeos extraíveis a massa total de solvente que restou na câmara de extração vezes a massa de solutos por unidade de massa de solvente.

Com o valor de M_a , torna-se possível o cálculo da fração mássica de soluto que permaneceu no sachê, X_{Ae} , considerando uma base livre de inertes (apenas os óleos restantes e o solvente retido na fase sólida), de acordo com a Equação 22:

$$X_{Ae} = \frac{M_a}{M_a + M_{solvente_retido}} \quad (22)$$

Pode-se ainda calcular o inverso da capacidade de retenção total da fase inerte, ou seja, a massa de inertes dividida pela soma das massas do óleo e do solvente retidos em cada sachê ao final dos experimentos, conforme a Equação 23:

$$N = \frac{M_{inertes}}{M_a + M_{solvente_retido}} \quad (23)$$

Os gráficos de Ponchon-Savarit são obtidos plotando-se os valores de X_{Ae} e X_{Ie} versus os valores de N , para cada uma das razões sólido-solvente (em massa) experimentais. Já os gráficos de McCabe-Thiele consistem na plotagem dos dados de X_{Ie} versus os dados de X_{Ae} , também para cada uma das razões sólido-solvente. Esses diagramas consistem em representações gráficas da relação existente no equilíbrio entre o extrato (fase líquida) e a lama, utilizadas para o cálculo do número de estágios teóricos de extração em metodologias simplificadas.

3.2.8 Esterificação pelo Método de Hartman-Lago

Primeiramente foram feitas extrações, tanto baseadas em pressão atmosférica constante quanto em HPCE a 200 kPa, nos mesmos moldes já tratados nas seções 3.2.5 e 3.2.6. O objetivo foi a obtenção do óleo de *Chlorella pyrenoidosa*, extraído por etanol NEON® ou por hexano NEON®, tanto para avaliar sua esterificação quanto para comparar a quantidade esterificável de acordo com o solvente utilizado.

O Método de esterificação proposto por Hartman e Lago baseia-se primariamente em dois tipos de soluções: a solução de hidróxido e a solução esterificante. Na preparação da solução de hidróxido 0,5 mol/L, 0,4 g de hidróxido de sódio foram adicionados a um balão volumétrico de 100,0 mL, e a seguir foram adicionados aos poucos, e sob vigorosa agitação, 20,0 mL de metanol. Na preparação da solução esterificante, 0,6666 g de cloreto de amônio foram misturados a 20,0 mL de metanol e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação constante por 15 minutos.

Foram transferidos 0,1 gramas de óleo extraído em cada uma das quatro condições (etanol ou hexano, Patm ou HPCE a 200 kPa, sempre com RMV 0,096) para tubos de ensaio. Os experimentos com etanol foram feitos em cinco replicatas,

enquanto que, por pouca disponibilidade de óleo extraído, os experimentos com hexano foram feitos em triplicata.

Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 1,5 mL da solução de hidróxido. Após tampados, esses tubos foram colocados em banho a 90°C por 10 minutos, e depois foram retirados e resfriaram até voltarem à temperatura ambiente. A cada tubo foram então adicionados 4,5 mL de solução esterificante, e novamente os tubos foram tampados e deixados em banho a 90°C, desta vez por 5 minutos.

Após resfriarem, os tubos receberam 3,5 mL de heptano cada um, e após agitação, também foram adicionados 5,0 mL de água deionizada. A separação entre as fases polar e apolar foi acelerada com o uso de centrífuga a 5000 RPM durante 20 minutos, conforme é destacado na Figura 10.



FIGURA 10 – Preparação da centrifugação das amostras bifásicas do Método de Hartman-Lago

A fase superior de cada tubo de ensaio, que é apolar e em teoria contém os óleos já esterificados, foi pipetada (2 mL) com auxílio de pipeta mecânica. Esse volume foi transferido para *ependorf's* compatíveis, de massas já conhecidas, os quais foram deixados em estufa a 50°C por 24 h, para vaporização do heptano e de outros componentes apolares indesejáveis. Após dessecação, por diferença entre as massas final e inicial (*ependorf* vazio), estimou-se a conversão de óleos de *Chlorella* em ésteres. Em teoria, 1 g de óleos pode gerar até 1g de ésteres.

3.2.9 Determinação do teor de cinzas

Foi determinado o teor de cinzas no óleo extraído de *Chlorella pyrenoidosa* com etanol, bem como o teor na biomassa bruta, a partir de experimento de decomposição térmica (carbonização seguida de calcinação). Amostras em triplicata foram adicionadas a cadinhos previamente calcinados e com massa aferida, e então foram deixadas em forno mufla a 550°C por 12 horas. Após dessecação, a massa do conjunto foi novamente medida. O teor de cinzas em relação à base sólida (desprezando a umidade) é dado pela Equação 24:

$$T_{cinzas} = \frac{m_{fc} - m_{ca}}{m_{am} * (1 - U_{b.u.})} \quad (24)$$

Na Equação 24, m_{fc} representa a massa final do conjunto cadinho mais calcinado após dessecação, m_{ca} é a massa inicial do cadinho vazio, m_{am} é a massa da amostra sendo avaliada e $U_{b.u.}$ é a umidade em base úmida da biomassa bruta, vinda do teste de secagem e utilizada apenas nos cálculos envolvendo amostras de *Chlorella*. Nos cálculos envolvendo teor de cinzas do óleo extraído, $U_{b.u.}$ foi aproximada a zero devido ao caráter fortemente apolar.

3.2.10 Estimativa do teor de fósforo dos óleos extraídos de *Chlorella pyrenoidosa* por espectrofotometria

Foi utilizada a Norma Internacional AOCS Ca 12-55 para determinar a quantidade de fósforo, contido em cinzas de amostras de óleos extraídos ou de biomassa bruta, através de medida espectrofotométrica com o complexo azul ácido fosfomolibdato. Esta Norma se aplica a óleos vegetais crus, degomados e refinados. Será apresentada aqui uma versão resumida do que foi feito experimentalmente. Para evitar efeitos dos possíveis detergentes residuais, toda a vidraria utilizada neste experimento foi anteriormente deixada em um banho com solução de ácido nítrico 6% em volume.

Foi colocado 1,0 grama de amostra (foram feitos testes tanto com a microalga bruta quanto com o óleo dela extraído por Soxhlet) em cadinho, ao qual foi adicionado 0,1667 g de óxido de zinco. A massa foi carbonizada em forno mufla a

600°C por 2 horas, e depois resfriada até temperatura ambiente. Às cinzas foram adicionados 1,67 mL de água destilada e 1,67 mL de HCl. Após coberto por vidro-relógio, cada cadinho foi aquecido até fervura suave (~ 5 min), e logo filtrado em recipiente com capacidade para 33,3 mL. O cadinho, o vidro-relógio e o papel-filtro foram lavados com água destilada quente para evitar perdas de material. A solução foi então passada para tubos de ensaio.

Após resfriar, a solução foi neutralizada até leve turvação com solução 50% de KOH. Foi adicionado novamente HCl até o óxido de zinco precipitado ser dissolvido. Então, foi completado o volume do tubo de ensaio com água destilada e feita agitação vigorosa no conjunto. Foram pipetados 3,33 mL da solução resultante com pipeta mecânica e adicionados a novos tubos de ensaio.

Foram adicionados 2,67 mL de sulfato de hidrazina 0,015% e 0,67 mL de solução de molibdato de sódio (7 mL H_2SO_4 + 18 mL água destilada + 0,6250 g molibdato) aos novos tubos de ensaio. Após tampar e inverter o conjunto por 4 vezes, a tampa foi afrouxada e cada tubo foi aquecido por 10 minutos em banho de água fervente. Depois, houve resfriamento por banho a 25°C e a solução foi passada para recipientes de 16,67 mL, aos quais se completou com água destilada até o volume.

Foram transferidos 2 mL de cada tubo de ensaio (Figura 11) para cubeta de espectrofotometria. A absorbância foi medida a 650 nm, usando uma cubeta contendo água destilada como parâmetro de 100% de transmitância. Se a absorbância medida foi maior que 0,9, foi feita diluição da solução em questão e posterior remedição.



FIGURA 11 – A cor azul característica da solução de complexo ácido fosfomolibdato

Todo o procedimento foi feito também em dois cadinhos sem adição de matéria graxa, para que se obtivesse o branco experimental. O padrão experimental foi obtido através de alíquotas de solução de hidrogeno fosfato de potássio (0,1097 g em 25 mL de água destilada). Foram obtidos valores conhecidos de absorbância para 0,0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,10 mg de fósforo, com os quais construiu-se a curva padrão de absorbância versus concentração de fósforo.

A porcentagem de fósforo na amostra foi estimada pela Equação 25:

$$\% \text{ fósforo} = \frac{10 (f_A - f_B)}{m_{am} * V_a} \quad (25)$$

Na Equação anterior, f_A é o conteúdo de fósforo na alíquota da amostra (mg), f_B é conteúdo de fósforo na alíquota do branco (mg), m_{am} é massa total da amostra em g, e V_a é o volume da alíquota tomada após a primeira agitação do conjunto experimental (3,33 mL).

3.2.11 Determinação do teor de ácidos graxos livres nos óleos extraídos

Este experimento teve por objetivo mensurar experimentalmente e de forma rápida a quantidade de ácidos graxos livres presentes nos óleos extraídos de *Chlorella pyrenoidosa*. Baseou-se na norma AOCS Ca 5a-40, que é aplicável a todos os óleos crus ou refinados de origem vegetal, a óleos de origem marinha e às gorduras animais.

Antes do experimento principal, foi preparada solução padronizada a 0,1 N de hidróxido de sódio, conforme AOCS H 12-52. Etanol NEON[®] foi neutralizado por esta solução através de titulação, obtendo-se a tonalidade rósea do ponto de viragem que persistiu por pelo menos 30 segundos.

Uma triplicata de amostras de $0,8841 \pm 0,0041$ g de óleo teve as massas mensuradas em erlenmeyers de 100 mL. Foram então adicionados, em cada erlenmeyer, 50 mL de etanol aquecido com pH já neutralizado, e também três gotas de solução 1% do indicador fenolftaleína. A solução foi então titulada com a solução padrão de hidróxido de sódio, até que novamente ocorresse a tonalidade rósea de viragem.

A porcentagem da massa de óleo total estimada pela Norma AOCS Ca 5a-40 como sendo ácido palmítico pode ser calculada pela Equação 26:

$$\% \text{ Ácidos graxos livres (palmítico)} = \frac{V_{et} * NOR * 28,2}{m_{am}} \quad (26)$$

Na Equação anterior, V_{et} corresponde ao volume de etanol neutralizado gasto na titulação (mL), NOR é a normalidade da solução padrão de NaOH, e m_{am} é a massa inicial da amostra em g. Para expressar o resultado em termos de índice de acidez (miligramas de KOH necessários para neutralizar 1 g de amostra), multiplica-se a porcentagem obtida na Equação 26 por 1,99.

3.2.12 Quantificação de clorofilas nas amostras de *Chlorella* e em seus óleos

Foi utilizada a norma AOCS CC13D-55 para quantificação da concentração de clorofilas a e b ($\mu\text{g} / \text{mL}$) através de medições de espectro de absorbância. Mediram-se valores para microalga em estado bruto e para óleos extraídos (por etanol e por hexano, e também pela mistura 2:1 em volume para etanol e hexano). Amostras de 0,05 g foram homogeneizadas através de 5 mL de acetona 80%. Os conjuntos foram filtrados, e após lavagem do filtro, transferidos para balões volumétricos de 100 mL, que foram então completados até o volume com acetona 80%.

Em balão de 50 mL foi adicionado 0,75 mL de acetona 80% e depois completado o volume com o extrato filtrado da etapa anterior. O branco experimental foi obtido em outro balão de 50 mL, no qual foi adicionado 0,75 mL de solução de ácido oxálico saturada em acetona, e depois foi completado com o extrato filtrado. Este procedimento serviu para forçar a conversão de clorofila para feofitina.

Após deixar todos os balões em repouso e ao abrigo de luz por 3 horas, foram medidas as absorbâncias, a 649 nm e 665 nm, dos extratos preparados. Em muitos casos a absorbância medida foi muito alta, exigindo novas diluições. A concentração de clorofilas totais na amostra foi calculada segundo a Equação 27:

$$\text{Clorofilas totais (a + b)} (\mu\text{g} / \text{mL}) = 6,45 * A_{665} + 17,72 * A_{649} \quad (27)$$

Na Equação anterior, A_{665} refere-se à leitura de absorbância a 665 nm no espectrofotômetro, e A_{649} à leitura a 649 nm. Para o cálculo da porcentagem mássica estimada de clorofila, usou-se a Equação 28:

$$\% \text{ mássica clorofilas} = \frac{\text{Clorofilas totais } (\mu\text{g} / \text{mL}) * ml_{dil}}{m_{am}} \quad (28)$$

Na Equação 28, ml_{dil} refere-se à quantidade total de acetona 80% utilizada na diluição do extrato filtrado, cujo valor mínimo foi de 50 mL, e m_{am} refere-se à massa inicial da amostra em μg .

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste Capítulo, serão apresentados os resultados dos experimentos citados no Capítulo 3, bem como as análises e informações deles extraídas. A plotagem dos gráficos aqui utilizados foi feita no software GRAPHER[®], enquanto que a maioria dos cálculos básicos foi feita em MICROSOFT EXCEL[®]. A regressão não linear dos dados através do Método de Levenberg-Marquardt foi feita no software STATISTICA[®].

4.1 PENEIRAMENTO DAS MICROALGAS

As massas retidas em cada peneira após a realização do experimento foram as seguintes:

TABELA 9 – Massas retidas no peneiramento das microalgas

Abertura série Tyler / MESH	Abertura ABNT / ASTM	Abertura (mm)	Massa retida (g)
35	35	0,5	Desprezível
80	80	0,177	Desprezível
100	100	0,15	3,3573
150	140	0,106	572,05
200	200	0,075	290,31
*PF	*PF	-	102,35

*PF indica a panela de fundo do conjunto de peneiramento

O uso de uma fração de diâmetro médio conhecido foi bastante importante no decorrer de todo o trabalho com a *Chlorella pyrenoidosa*, já que o impacto que este fator teria em todos os experimentos de extração subsequentes foi minimizado. Foi utilizada no decorrer do trabalho a maior fração retida por peneiramento, ou seja, a massa algal que ficou retida na peneira de 150 MESH, equivalente a mais da metade da massa total disponível. O diâmetro médio da fração utilizada era de (0,15

$$+ 0,106) / 2 = 0,128 \text{ mm.}$$

4.2 TESTE DE SECAGEM

Os resultados da secagem efetuada em *Chlorella pyrenoidosa* através de estufa a vácuo, calculados a partir da Equação 10, estão expressos na Tabela 10:

TABELA 10 – Umidade em base úmida obtida para a *Chlorella*

AMOSTRA	MASSA DE MICROALGA (g)	U _{b.u.} (%)
1	1,0007	2,5382
2	1,0009	2,4978
3	1,0007	2,4783
U _{b.u.} MÉDIA (%)		2,5047

O valor obtido para a umidade em base úmida da microalga estudada é de $2,5047 \pm 0,03\%$, relativamente baixo se comparado a outros tipos de biomassa residual. Este valor é significativamente menor que o obtido por BRANDALIZE (2014) ($4,21 \pm 0,04\%$ de umidade em base úmida), que utilizou um produto de mesma origem e mesmo lote em seus trabalhos. Isso pode indicar, neste quesito, falta de uniformidade nos produtos comercializados pela respectiva fornecedora, ou pode indicar ainda diferenças nos métodos de armazenamento e proteção ao ambiente adotados pelos autores. A umidade é uma variável importante em trabalhos de extração, já que a água cria uma barreira polar entre os solventes e os lipídeos extraíveis, o que pode acabar diminuindo a eficiência da transferência de massa no processo (BRANDALIZE, 2014).

4.3 EXPERIMENTOS DE EXTRAÇÃO EXAUSTIVA POR SOXHLET

Na Tabela 11 estão resumidos os resultados obtidos nos experimentos de extração exaustiva pelo Método de Soxhlet. Todos os valores são dados em base seca, isto é, já descontando da massa inicial de microalga a sua umidade, determinada pelo teste de secagem (Item 4.2).

TABELA 11 – Rendimentos de extração em *Chlorella* obtidos pelo Método de Soxhlet

Amostra	Solvente	Massa de Microalga (g)	Massa de óleo (g)	η (%)
A	Etanol	3,5022	0,5262	15,41
B	Etanol	3,5010	0,4666	13,67
C	Etanol	3,5003	0,6154	18,03
D	Hexano	3,5014	0,0925	2,71
E	Hexano	3,5039	0,0928	2,72
η médio (Etanol) (%)				$15,70 \pm 2,19$
η médio (Hexano) (%)				$2,72 \pm 0,01$

Os resultados obtidos pelo Método de Soxhlet mostraram grande diferença nas quantidades extraídas por etanol e por hexano, sendo que o primeiro extraiu 5,8 vezes mais que o segundo. Tais valores servem como referência da escolha do etanol, neste caso, como melhor solvente de extração. Além disso, revelam a afinidade polar da maioria dos constituintes lipídicos da *Chlorella*. Conforme dados da Tabela 4, o etanol extrai grande parte dos fosfolipídeos e glicolipídeos presente na matriz, enquanto que maioria dos componentes extraídos com hexano é caracterizada como triacilgliceróis e ácidos graxos.

Compararam-se os resultados obtidos neste experimento com aqueles obtidos por BRANDALIZE (2014) com microalga de mesmo lote ($11,98 \pm 1,92\%$ para o etanol, $1,78 \pm 0,41\%$ para o hexano). Com 90% de confiança ($p > 0,1$), os experimentos tiveram resultados não divergentes em ambos os solventes.

4.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO AUXILIADA POR HPCE EM *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

Depois de determinada experimentalmente a densidade real do etanol NEON[®] ($0,783 \text{ g / cm}^3$), foram executados testes de extração com este mesmo solvente, a 30°C , à pressão atmosférica ou com pulsos de HPCE, conforme exposto nas Seções 3.2.5 e 3.2.6. O primeiro objetivo traçado foi comparar experimentalmente os resultados obtidos com HPCE frente à extração à P_{atm} , para verificação de possíveis alterações no equilíbrio de extração, sobretudo na fração mássica de soluto em equilíbrio na fase líquida (X_{le}). Esta grandeza indica, em essência, quanto de matéria lipídica é passível de ser extraída em cada método.

Devido ao grande volume de dados obtido, não serão apresentadas neste

Capítulo 4 as tabelas completas contendo os resultados experimentais referentes aos experimentos aqui tratados. Essas tabelas estão disponíveis, porém, no ANEXO II deste trabalho. A cada corrida experimental, foram acrescentados pontos iniciais (0,0) para fins de regressão não linear do conjunto, pois o valor de X_t no tempo zero de experimento é também igual a zero. Pontos experimentais que não apresentaram conformidade com o conjunto final de cada experimento foram excluídos utilizando-se o Teste dos Escores Padronizados (Teste Z).

Foi selecionada a RMM de 0,096 (2,25 g de microalga no sachê / 23,49 g de solvente etanol na câmara de extração) para avaliação dos efeitos da HPCE. Após os experimentos, foi feita regressão não linear dos dados obtidos utilizando-se as Equações (4) e (5), com Método de Levenberg-Marquardt iterando no Método dos Mínimos Quadrados, e $X_{t=0}$ igual a zero, a fim de verificar a ordem da extração. As duas Equações geraram resultados satisfatórios em testes de Análise de Variância e de R^2 , porém ligeiramente melhores para um modelo de 1ª ordem clássico de extração. A partir do número de dados coletado em cada caso específico, calculou-se então a incerteza para cada valor de X_{te} obtido através da Equação (6), e com a Equação (9) foi feita a comparação um a um dos parâmetros para verificação de similaridade.

Os valores para a taxa de extração k_1 também foram obtidos por regressão não linear. Porém deve-se atentar ao detalhe de que não se teve o objetivo de avaliar a cinética da extração de forma mais completa neste trabalho. Os diversos pontos experimentais coletados foram utilizados apenas para estimativas confiáveis de X_{te} , e de outros parâmetros importantes, como o rendimento de equilíbrio. De qualquer modo, os valores de k_1 para cada conjunto de condições de extração encontram-se no ANEXO III deste trabalho.

Os gráficos das Figuras 12, 13, 14 e 15 ilustram os dados experimentais obtidos para cada condição de pressão aplicada à RMM de 0,096, e também as curvas de 1ª ordem obtidas para o melhor ajuste, já com seus X_{te} estimados e suas incertezas a um nível de 90% de confiança (não se chegou à condição real de equilíbrio em nenhum caso estudado). Os valores de X_t em cada ponto experimental foram calculados através da Equação 16.

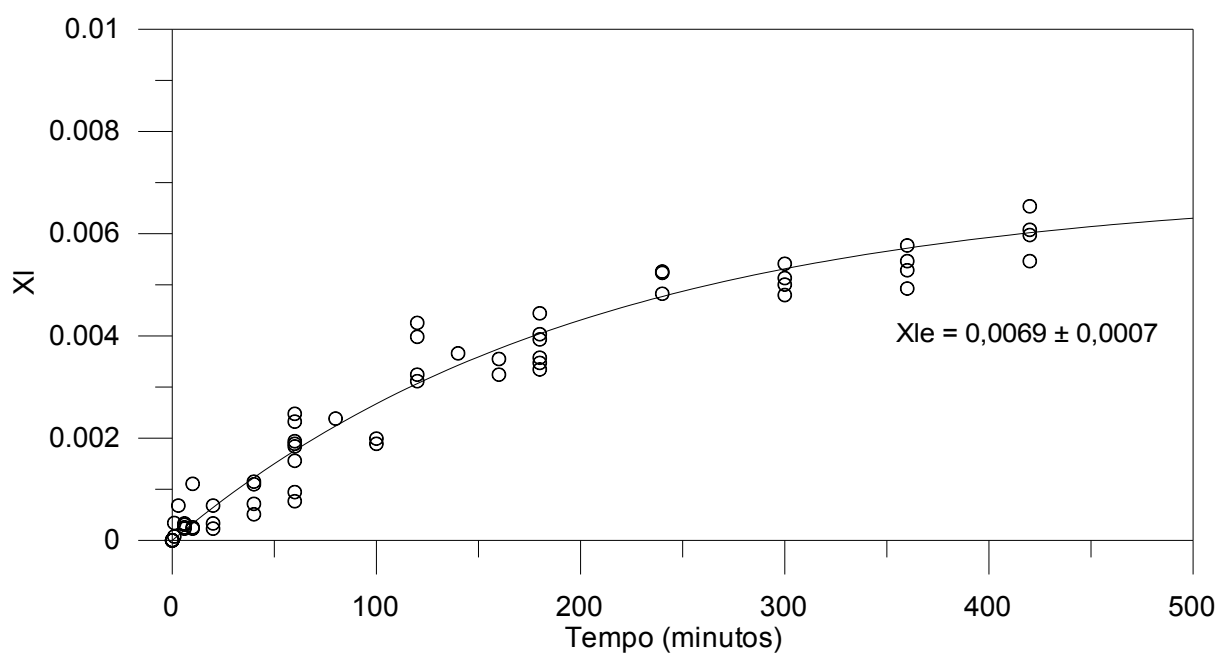


FIGURA 12 - Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, Patm e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear (Corridas experimentais 1, 2, 3 e 4 do ANEXO II)

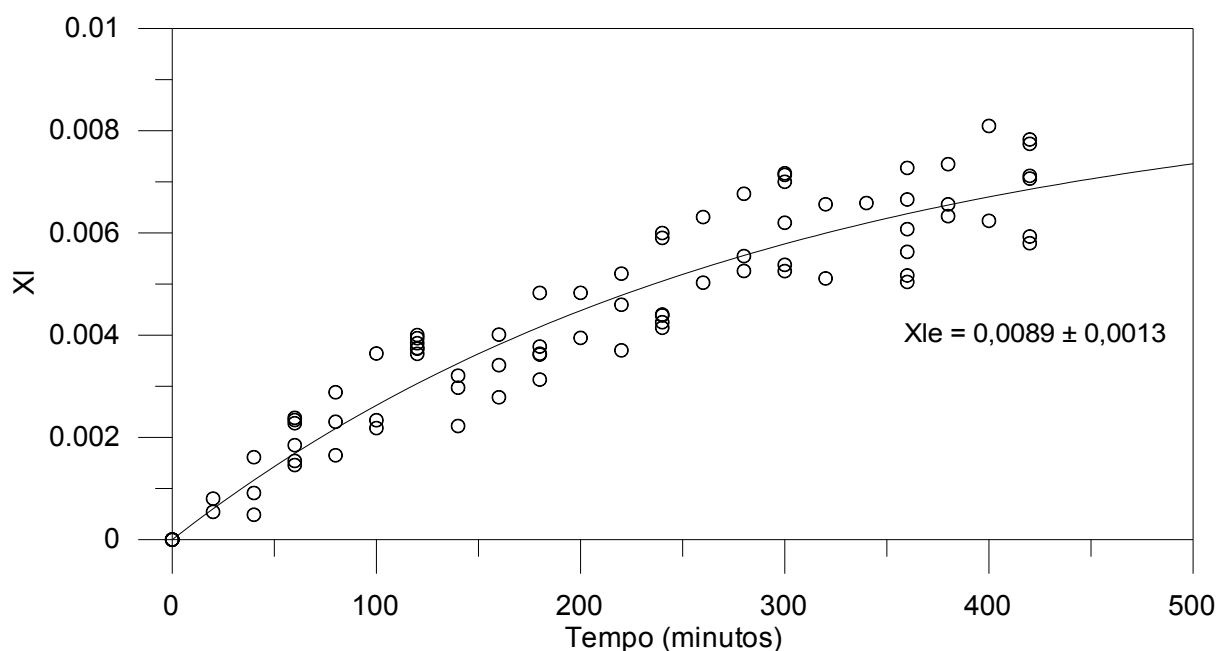


FIGURA 13 – Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, 200 kPa e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear (Corridas experimentais 5, 6 e 13 do ANEXO II)

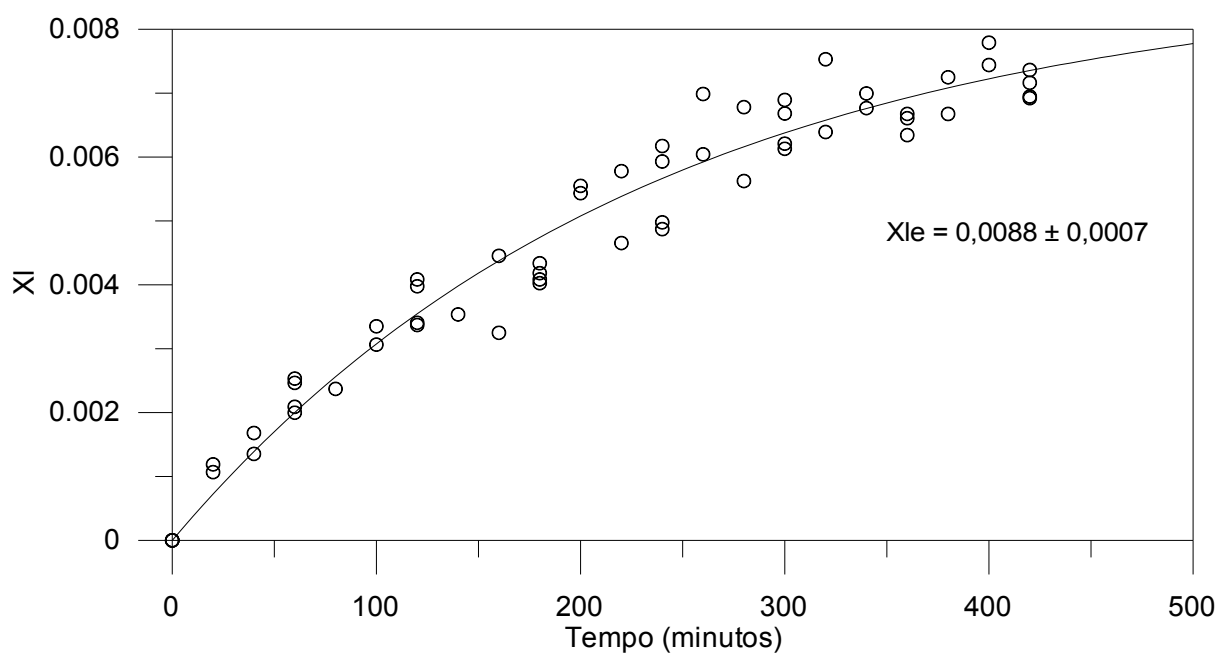


FIGURA 14 – Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, 400 kPa e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear (Corridas experimentais 7 e 8 do ANEXO II)

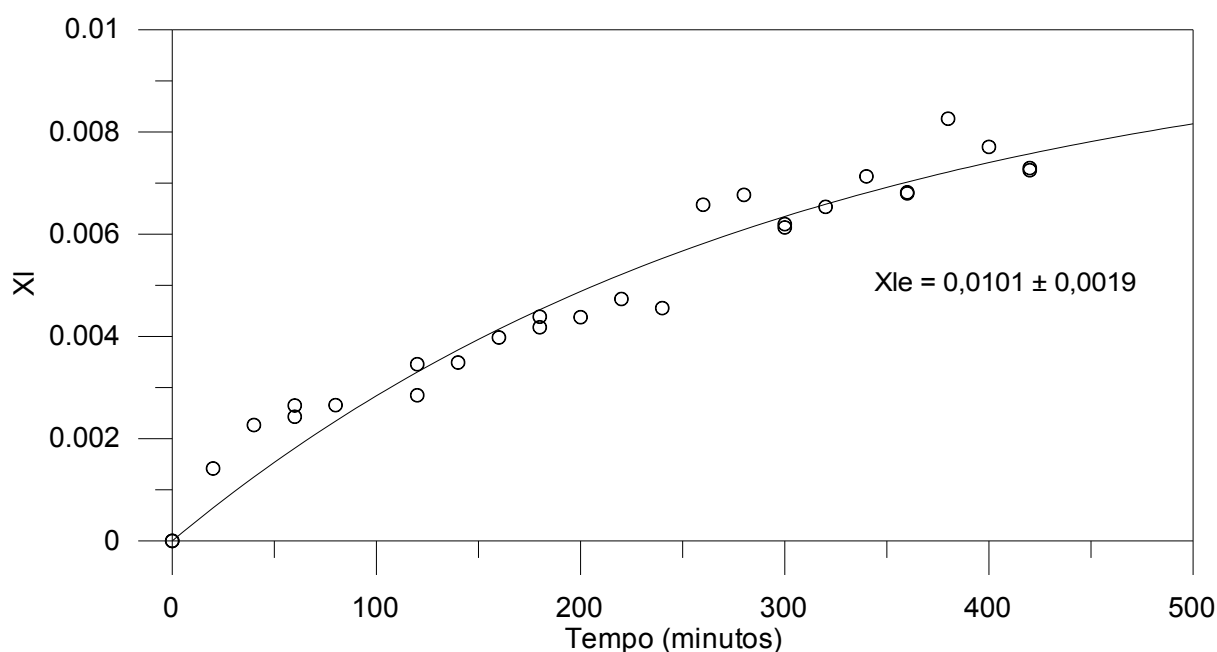


FIGURA 15 – Os símbolos indicam os pontos experimentais obtidos para a condição de extração a 30°C, 600 kPa e RMM 0,096; a curva indica o melhor ajuste para uma extração de 1ª ordem; e X_{le} é o valor da fração mássica de soluto na fase líquida na condição de equilíbrio, estimada por regressão não linear (Corrida experimental 9 do ANEXO II)

Os valores obtidos para X_{le} em cada caso foram comparados estatisticamente, de modo a se obter os resultados presentes na Tabela 12:

TABELA 12 – Verificação da similaridade entre os valores de X_{le} obtidos em diferentes condições na RMM 0,096 (letras iguais ao lado de cada valor de X_{le} indicam casos que não diferem estatisticamente a um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))

Condição	Nº pontos experimentais	R ²	F*	X_{le}	ΔU_1	ΔU_2	ΔU_3	ΔU_4
91,4 kPa	65	0,95	1768	$0,0069 \pm 0,0007^A$	-	0,0015	0,0010	0,0020
HPCE 200 kPa	82	0,90	1780	$0,0089 \pm 0,0013^B$	0,0015	-	0,0015	0,0023
HPCE 400 kPa	57	0,95	3587	$0,0088 \pm 0,0007^B$	0,0010	0,0015	-	0,0020
HPCE 600 kPa	28	0,95	1330	$0,0101 \pm 0,0019^B$	0,0020	0,0023	0,0020	-

Na Tabela 12, ΔU_1 , ΔU_2 , ΔU_3 e ΔU_4 referem-se às incertezas combinadas entre cada condição estudada e as condições de Patm, HPCE a 200 kPa, HPCE a 400 kPa e HPCE a 600 kPa, respectivamente. Comparando-se os valores, percebe-se que a 1ª condição é estatisticamente diferente de todas as demais, enquanto que a 2ª, a 3ª e a 4ª condições são estatisticamente semelhantes entre si.

Fica evidenciada a influência da aplicação dos ciclos de pressão hidrostática (HPCE) no aumento do valor da fração mássica de soluto em equilíbrio na fase líquida (X_{le}). Ou seja, com 90% de confiança, a técnica teve o efeito esperado na investigação da extração de *Chlorella pyrenoidosa* com etanol, aumentando a quantidade de óleos extraíveis no equilíbrio, sem necessitar de aumento de temperatura ou de variáveis como o grau de agitação (segundo NAVIGLIO (2003), a HPCE induz a uma agitação interna natural do sistema). Essa influência é provavelmente um resultado da transferência de massa convectiva, devido ao fluxo da solução gerado nos micro canais do sólido pela ação do gradiente negativo de pressão durante a fase dinâmica. A transferência de massa, dada na forma difusiva em condições atmosféricas, passa a ter caráter difusivo-convectivo quando da aplicação dos ciclos de pressão (KOTOVICZ E ZANOELO, 2013). Há a quebra de paredes celulares e de tecidos microalgais, causada pelos ciclos de pressão, e que facilita a remoção de lipídeos do sistema.

Verifica-se ainda que, apesar dos ciclos de pressão terem efeito importante, as diferentes pressões exercidas nas compressões das câmaras de extração tiveram efeito estatisticamente semelhante sobre X_{le} , do qual pode se afirmar que este fator

não é uma variável de influência no sistema proposto. Devido a isto, as comparações posteriores para verificação de efeitos na extração de *Chlorella* foram executadas, quando do uso da HPCE, apenas a 200 kPa, uma vez que esta pressão era mais acessível no conjunto durante os experimentos.

Como já verificado por KOTOVICZ E ZANOELO (2013) e ORTIZ (2015) em trabalhos anteriores, a taxa de transporte de massa diminui exponencialmente com o tempo experimental. Este comportamento já é conhecido e deve-se ao gradiente de concentração de lipídeos, que é muito maior no início do experimento, permitindo uma rápida transferência de massa da matriz sólida para o solvente.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS DIFERENTES RMM's SOBRE X_{le}

Também foram executados experimentos baseados em razões massa de sachê / massa de solvente diferentes, de forma a analisar a influência deste parâmetro no teor de lipídeos extraídos. A Tabela 13 resume os dados obtidos à pressão atmosférica em diferentes RMM's. As tabelas experimentais completas encontram-se no ANEXO II deste documento.

TABELA 13 – Valores de X_{le} obtidos à pressão atmosférica em diferentes RMM's (letras iguais ao lado de cada valor de X_{le} indicam casos que não diferem estatisticamente a um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))

Condição	Nº pontos experimentais	R ²	F [*]	X_{le}
RMM 0,043	48	0,94	1361	$0,0038 \pm 0,0002^A$
RMM 0,096	65	0,95	1768	$0,0069 \pm 0,0007^B$
RMM 0,149	56	0,94	2424	$0,0103 \pm 0,0007^C$
RMM 0,202	29	0,96	1724	$0,0154 \pm 0,0022^D$
RMM 0,255	26	0,93	1017	$0,0143 \pm 0,0012^D$

O cálculo das incertezas combinadas segue a Equação 9. De acordo com a Tabela 13, é forte a evidência ($p \leq 0,1$) de que a razão entre massa da matriz algal e massa de solvente é um fator determinante na quantidade de soluto presente no etanol no equilíbrio de extração. Quanto menor é a RMM, menor é quantidade de lipídeos passível de ser extraída pelo método. Entretanto, esta relação tem um limite em sua validade, como pode ser visto na 4ª e 5ª condições da Tabela analisada. Na RMM de 0,255 (sachês de 6,00 g), o solvente possivelmente está próximo à sua

saturação em lipídeos de *Chlorella*, de modo que a diferença estatística entre a X_{le} deste caso e a do caso de RMM 0,202 inexistiu ($p > 0,1$) com 90% de confiança. Este parâmetro é importante no dimensionamento de extratores, uma vez que excessos de massa na matriz sólida ocupam espaço desnecessário, não implicam em aumento de X_{le} , e ainda diminuem muito o rendimento da extração, como será visto adiante.

As RMM's foram comparadas também a 200 kPa, sendo expressos os valores de X_{le} na Tabela 14.

TABELA 14 – Valores de X_{le} obtidos à pressão de 200 kPa em diferentes RMM's (letras iguais ao lado de cada valor de X_{le} indicam casos que não diferem estatisticamente a um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))

Condição	Nº pontos experimentais	R ²	F*	X _{le}
RMM 0,043	54	0,89	2012	0,0040 ± 0,0002 ^A
RMM 0,096	82	0,90	1780	0,0089 ± 0,0013 ^B
RMM 0,149	29	0,96	1618	0,0116 ± 0,0014 ^C
RMM 0,202	29	0,90	690	0,0162 ± 0,0039 ^D
RMM 0,255	29	0,97	2116	0,0165 ± 0,0014 ^D

Neste caso, ficam claros também os efeitos das diferentes RMM's sobre o conteúdo lipídico extraível pela técnica da HPCE. Novamente, constatou-se a possibilidade de saturação do etanol em massas elevadas de sachê.

As Tabelas 13 e 14 mostram que a relação entre os valores da RMM e de X_{le} não é linear, tendo este último valor proporcionalmente mais alto para RMM's baixas. Uma das formas de se estudar este comportamento experimental é a quantificação dos rendimentos de extração.

4.6 ANÁLISE DOS DIFERENTES RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

O cálculo do rendimento μ da extração, tanto nos casos à pressão atmosférica quanto com uso de HPCE, segue a Equação 17. Como o rendimento é função de X_{le} e de constantes, a expressão da Equação 8, aplicada a este caso, toma a forma:

$$U_{\eta} = \frac{\partial \mu}{\partial X_{le}} * U_{Xle} \quad (29)$$

Calculando a derivada $d\mu / dX_{le}$ e aplicando a Equação 29 à Equação 17, tem-se que a incerteza para os rendimentos calculados para cada caso é calculada por:

$$U_{\mu} = \frac{100 M_s}{(1-U_{b.u.}) M_m} \left[\frac{1}{1-X_{le}} - \frac{X_{le}}{(1-X_{le})^2} \right] U_{X_{le}} \quad (30)$$

O gráfico da Figura 16 apresenta os rendimentos em extrato para os experimentos de extração em *Chlorella* com RMM 0,096. O rendimento obtido com aplicação de HPCE é, com 90% de confiança em Teste t, maior que o rendimento obtido à Patm, mantidas as outras condições ($p \leq 0,1$). A influência da pressão exercida nos pulsos sobre o rendimento foi menor que as incertezas, de modo que a HPCE a 200 kPa surtiu os mesmos efeitos estatísticos sobre μ que as aplicações de ciclos a 400 e a 600 kPa. Essas observações são as mesmas citadas na seção 4.4, e isso se deve ao fato de que o rendimento é função apenas de X_{le} e de constantes em uma mesma RMM.

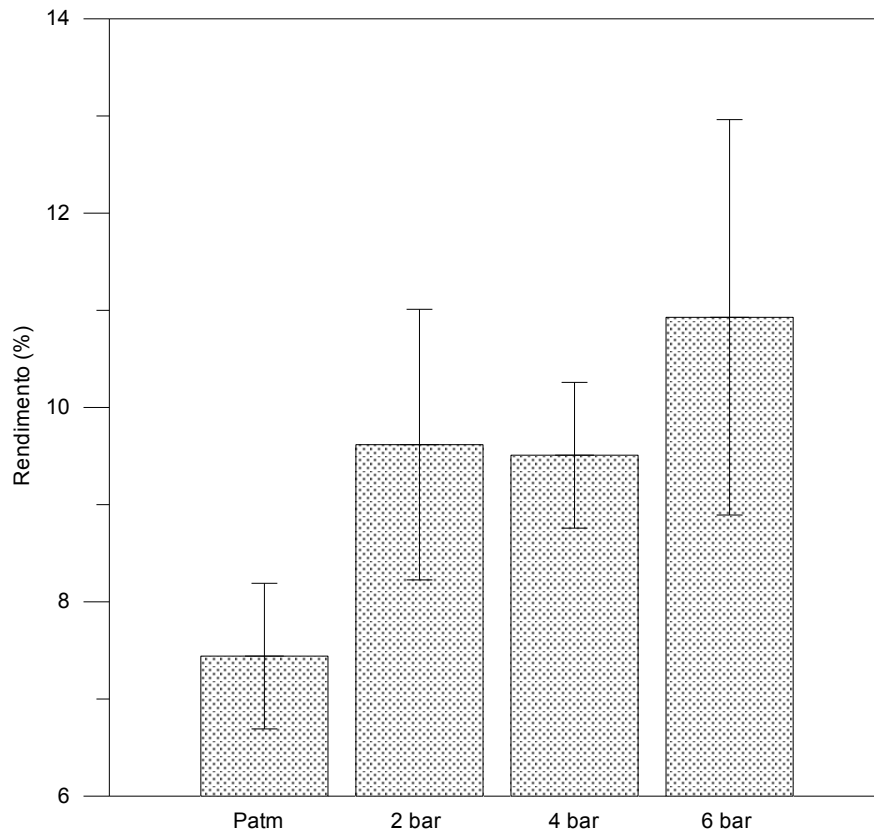


FIGURA 16 – Rendimentos de extração de equilíbrio obtidos em diferentes condições de pressão para RMM = 0,096

Em condições de equilíbrio, a eficiência da extração auxiliada por HPCE a 200 kPa, frente à extração pelo Método de Soxhlet (tratada aqui como extração exaustiva de óleos), foi de aproximadamente 61%, enquanto que a eficiência da extração à pressão atmosférica foi de aproximadamente 47%. Isso implica num aumento de rendimento de aproximadamente 30% com o uso da HPCE.

De acordo com a Equação 17, μ é também função da massa de microalga contida em cada sachê (m_m), de modo que os rendimentos tiveram tendência de aumento quando se utilizaram as menores RMM's, conforme Tabela 15. Esse comportamento deve-se às diferentes acessibilidades do solvente às partes internas de cada sachê com diferentes massas. Apesar de se ter verificado a molhabilidade completa em todos os sachês de extração (que eram avaliados após o término dos experimentos), não se pode desprezar a influência da resistência e da compactação do leito de sachê à transferência de massa. Durante o experimento, possivelmente ocorreu congestionamento de solvente dentro dos maiores sachês. Isso limitou a extração dentro de certos períodos, nestes casos, às partes externas do leito de biomassa. Tal efeito ocorre em menores proporções nos sachês menores, uma vez que o caminho necessário para o solvente atingir as partículas mais centrais é menor.

Somado ao fator anterior, não se pode desprezar a saturação do etanol como fator importante no decréscimo do rendimento obtido nos experimentos de RMM 0,255. A eficiência nessa condição de extração e à P_{atm} foi de apenas ~37%.

TABELA 15 - Rendimentos de extração de equilíbrio em diferentes RMM's, à P_{atm} ou com HPCE a 200 kPa (condições seguidas de letras semelhantes tiveram resposta estatisticamente equivalente em um nível de confiança de 90% ($p > 0,1$))

Condição	Rendimento (%)	$U_{rendimento}$ (%)	Eficiência estimada em relação a Soxhlet (%)
P atm; RMM 0,043 ^A	9,19	0,48	58,54
P atm; RMM 0,096	7,44	0,75	47,39
P atm; RMM 0,149 ^B	7,17	0,48	45,67
P atm; RMM 0,202	7,94	1,12	50,57
P atm; RMM 0,255 ^C	5,83	0,48	37,13
200 kPa; RMM 0,043 ^A	9,68	0,48	61,66
200 kPa; RMM 0,096	9,62	1,39	61,27
200 kPa; RMM 0,149 ^B	8,08	0,96	51,46
200 kPa; RMM 0,202	8,35	1,98	53,18
200 kPa; RMM 0,255 ^C	6,74	0,56	42,93

Para comparação experimental, foi novamente utilizado o trabalho de BRANDALIZE (2014). Os fatores utilizados pelo autor citado nos experimentos envolvendo extração por ultrassom, e que usualmente impactam nos valores de X_i (tipo de matriz sólida, tipo de solvente, RMM, temperatura e pressão atmosférica) foram semelhantes aos utilizados na segunda condição da Tabela 15. O rendimento em lipídeos obtido neste estudo, nesta condição, foi de $7,44 \pm 0,75\%$. Já BRANDALIZE obteve $6,5 \pm 0,9\%$ em seus estudos com um microalga de mesmo lote. Estes dois valores não diferem estatisticamente com um nível de confiança de 90% em um Teste t ($p > 0,1$), de forma que esta é uma boa evidência da consistência dos resultados obtidos a partir dos experimentos de avaliação do equilíbrio de extração em *Chlorella*.

Apesar dos rendimentos obtidos serem comparáveis, houve grande diferença entre o tempo estimado para se chegar à condição de equilíbrio supracitada (segunda condição da Tabela 15 - após aproximadamente 29147 s) frente ao tempo utilizado no trabalho de BRANDALIZE (512 s). Isso se deveu ao fato de que no trabalho atual a extração foi conduzida em sachês, enquanto que BRANDALIZE dispersou as microalgas em etanol. Os sachês criam uma resistência à transferência de massa externa, pois o leito de sólidos no interior deles tem baixa permeabilidade. No entanto, com tempos menores, não seria possível avaliar os efeitos da HPCE neste trabalho, uma vez que um único ciclo de pulsos leva 600 segundos para ser completado.

4.7 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE ÓLEOS NA MATRIZ SÓLIDA

Após 12 horas de extração, foram obtidos os resultados expostos na Tabela 16. A massa de solvente retido em cada ponto experimental foi calculada através da Equação 18, enquanto que a massa de inertes foi obtida através da Equação 19. A massa de solvente retida por massa de inertes (M) veio da aplicação da Equação 20.

TABELA 16 – Dados relativos à retenção na matriz sólida para diferentes RMM's

RMM	Massa do sachê (g)	M_m (g)	M_s (g)	Massa úmida (g)	Massa após secagem (g)	$M_{solvente_retido}$ (g)	$M_{inertes}$ (g)	M	M Médio por RMM
0,096	0,9475	2,2531	23,4938	6,1931	3,1708	1,9931	1,8517	1,0764	1,0398
	0,9365	2,2527	23,4977	6,0284	3,1539	1,8573	1,8514	1,0032	
0,149	0,9951	3,5080	23,4912	8,2755	4,2880	2,9066	2,8830	1,0082	1,0026
	0,9586	3,5024	23,4955	8,1566	4,2455	2,8699	2,8784	0,9970	
0,202	0,9716	4,7567	23,4996	10,3536	5,4096	3,8887	3,9092	0,9947	1,0058
	0,9766	4,7513	23,4961	10,4510	5,4199	3,9703	3,9048	1,0168	
0,255	0,9322	6,0010	23,4918	12,1631	6,4362	4,7144	4,9319	0,9559	0,9618
	0,9953	6,0019	23,4997	12,3622	6,5077	4,7734	4,9326	0,9677	

Os dados relativos à retenção de solvente exclusivamente no papel-filtro dos sachês de extração encontram-se na Tabela 17.

TABELA 17 – Retenção de solvente exclusivamente no papel-filtro dos sachês de extração

Amostra	Massa do sachê (g)	Massa do sachê úmido (g)	Massa de solvente retido (g)	$L1$	$L1$ médio
1	0,8802	1,9569	1,077	1,223	1,086
2	0,8997	1,9013	1,002	1,113	
3	0,8697	1,6716	0,802	0,922	

Através dos dados expostos nas Tabelas 16 e 17, foi possível calcular os valores de M_a para cada caso (Equação 21), e então se fez o cálculo de X_{Ae} (Equação 22) e N (Equação 23) médios para cada RMM. Com os valores obtidos, foi possível plotar os gráficos das Figuras 17A, 17B, 17C e 17D, já considerando os valores de X_{le} correspondentes obtidos nas Seções 4.4 e 4.5. A fase líquida foi considerada livre de sólidos suspensos, sendo então $M_{inertes}$ e N iguais a zero nessa fase.

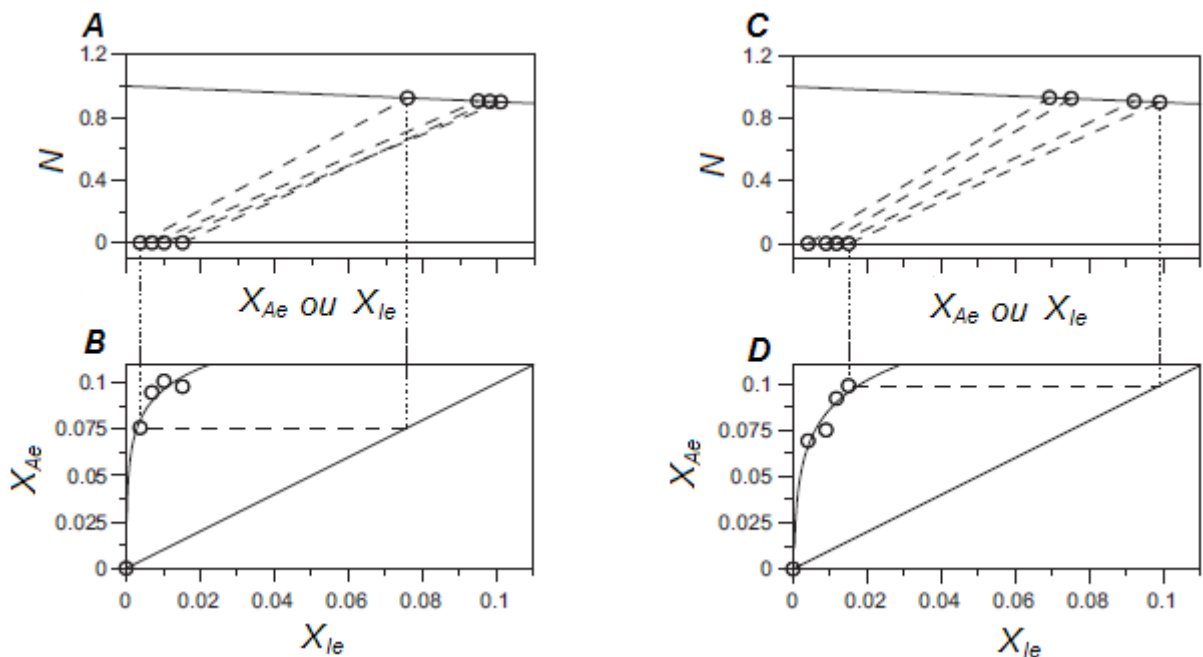


FIGURA 17A – Diagrama de Ponchon-Savarit para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em *Chlorella* à Patm e em diferentes RMM's

FIGURA 17B – Diagrama de McCabe-Thiele para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em *Chlorella* à Patm e em diferentes RMM's

FIGURA 17C – Diagrama de Ponchon-Savarit para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em *Chlorella* com HPCE a 200 kPa e em diferentes RMM's

FIGURA 17D – Diagrama de McCabe-Thiele para representação do equilíbrio entre as fases sólida e líquida após extração em *Chlorella* com HPCE a 200 kPa e em diferentes RMM's

As *tie-lines* não verticais dos diagramas de Ponchon-Savarit dos gráficos das Figuras 17A e 17C indicam que a soma de $M_{\text{solvente_retido}}$ e M_a (ou seja, a massa total de solução retida pela microalga estudada) não é constante nos diferentes casos. Uma das explicações para este resultado é de que o soluto está adsorvido na superfície da fração de inertes, o que descaracteriza M_{inertes} como uma fase verdadeiramente inerte.

Os valores de X_{ae} , comparados aos valores de X_{le} nos diagramas de McCabe-Thiele (gráficos das Figuras 17B e 17D) são muito maiores, indicando que a quantidade de óleos a ser extraída pelo solvente até o equilíbrio seria muito menor que aquela quantidade que permaneceria retida. Valores de X_{le} a 30 °C superiores aos encontrados neste trabalho estão disponíveis na literatura, a exemplo dos de BRANDALIZE (2014), indicando que este efeito não é puramente uma limitação do

equilíbrio de extração. Nas condições estudadas, o contato efetivo entre o etanol não retido e os lipídeos da parte mais interna dos sachês de biomassa foi prejudicado, uma vez que houve acúmulo de solvente em certas regiões, dificultando a formação e difusão do complexo lipídico para o seio do líquido. Com isso, os óleos extraíveis permaneceram preferencialmente na fase sólida, mesmo após o equilíbrio ser atingido. A hipótese de que $X_{ae} = X_{ie}$, muitas vezes adotada para o cálculo do número de estágios teóricos de contato no dimensionamento industrial, não é válida neste caso (FAGGION *et al.*, 2015).

4.8 ESTERIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE HARTMAN-LAGO

As conversões experimentais dos óleos extraídos de *Chlorella pyrenoidosa* em ésteres são dadas na Tabela 18.

TABELA 18 – Conversões experimentais dos óleos extraídos de *Chlorella* e esterificados pelo Método de Hartman-Lago

Amostra	Solvente	Condição de Extração	Mm	Rendimento (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)
1	Etanol	Patm (91,4 kPa)	0,1031	73,67	70,50	4,65
2	Etanol	Patm (91,4 kPa)	0,1041	67,92		
3	Etanol	Patm (91,4 kPa)	0,1018	75,12		
4	Etanol	Patm (91,4 kPa)	0,1053	65,31		
5	Etanol	HPCE 200 kPa	0,1018	69,45	73,78	3,73
6	Etanol	HPCE 200 kPa	0,1056	74,91		
7	Etanol	HPCE 200 kPa	0,1097	72,42		
8	Etanol	HPCE 200 kPa	0,1004	79,48		
9	Etanol	HPCE 200 kPa	0,1072	72,64		
10	Hexano	Patm (91,4 kPa)	0,1036	66,55	64,41	4,91
11	Hexano	Patm (91,4 kPa)	0,1044	67,89		
12	Hexano	Patm (91,4 kPa)	0,1408	58,79		
13	Hexano	HPCE 200 kPa	0,1064	62,50	64,51	1,75
14	Hexano	HPCE 200 kPa	0,1096	65,31		
15	Hexano	HPCE 200 kPa	0,0972	65,72		

Os valores obtidos para o solvente etanol não diferem entre si, com 90% de confiança em $p > 0,1$. Isso indica que a aplicação de HPCE na extração, apesar de aumentar a quantidade de lipídeos extraíveis, não modifica o percentual esterificável destes. Conclusão semelhante também foi encontrada para o hexano, com $p > 0,1$.

Este resultado vai à contramão de evidências anteriores da literatura que apontavam que a HPCE seria capaz inclusive de propiciar a extração de compostos insolúveis no solvente utilizado (NAVIGLIO, 2003; NAVIGLIO *et al.*, 2008).

Os valores de rendimento (g óleo esterificado / g óleo utilizado) obtidos utilizando o etanol como solvente são aparentemente maiores que aqueles obtidos para o hexano. Porém, devido às elevadas incertezas inerentes, é possível afirmar apenas que, com 90% de confiança ($p \leq 0,1$), o rendimento de esterificação dos óleos extraídos com etanol e com aplicação de HPCE a 200 kPa foi maior que o dos óleos extraídos com hexano nas mesmas condições. Esta resposta não era esperada, pois o hexano geralmente é utilizado como padrão experimental nas extrações, enquanto que o etanol é conhecido por extrair também impurezas (já mencionadas na Seção 3.1.2). No entanto, fica evidenciada a presença de maior quantidade de lipídeos e compostos extraíveis de caráter polar, uma vez que estes apresentam maior afinidade com o etanol e afinidade muito limitada com o hexano. Novamente, o etanol é o solvente selecionado para extração em *Chlorella*, não só pela quantidade extraída, mas também pela conversão em ésteres alcançada.

Os rendimentos totais de produção de ésteres (g óleo esterificado / g microalga nos sachê) através de extração em *Chlorella pyrenoidosa* com etanol, considerando os rendimentos obtidos na Seção 4.6 para RMV igual a 0,096, foram de 5,25% para óleo extraído à Patm e de 7,10% para óleo extraído com HPCE a 200 kPa, um aumento de aproximadamente 35%.

4.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

Os teores de cinzas obtidos para *Chlorella pyrenoidosa* e para o óleo extraído por etanol (Patm, 30°C, 3 horas) através da Equação 24, já descontada a umidade obtida no teste de secagem, são ilustrados na Tabela 19.

O teor de cinzas da microalga bruta indica resquícios de minerais que muito provavelmente foram utilizados para nutrição da biomassa, como foi visto na Seção 2.2.5. E as cinzas presentes no óleo são derivadas dos compostos extraídos que se apresentam como complexos ou como derivados destes minerais. Um exemplo destes compostos são os fosfolipídeos.

TABELA 19 – Teor de cinzas de amostras de *Chlorella* bruta e de óleo extraído

Amostra	Conteúdo	Cinzas (%)	Média de cinzas (%)	Desvio padrão (%)
1	<i>Chlorella</i> bruta	3,95	4,10	0,20
2	<i>Chlorella</i> bruta	4,03		
3	<i>Chlorella</i> bruta	4,32		
4	Óleo extraído por etanol	1,81	1,91	0,10
5	Óleo extraído por etanol	1,90		
6	Óleo extraído por etanol	2,01		

4.10 ESTIMATIVA DO TEOR DE FÓSFORO EM *CHLORELLA PYRENOIDOSA* E NOS ÓLEOS DELA EXTRAÍDOS

Os dados obtidos para construção da curva padrão de estimativa de fósforo estão representados na Tabela 20. Foram feitas diferentes dissoluções nas diversas soluções para a obtenção de uma curva padrão que contemplasse todo o intervalo de absorbância obtido no experimento original. A amostra relativa ao teor de fósforo teórico de 0,04 mg foi excluída por apresentar diferença substancial em relação à tendência apresentada pelos outros pontos experimentais.

TABELA 20 – Dados obtidos para construção da curva padrão do experimento de estimativa do teor de fósforo nos óleos extraídos de *Chlorella*

Amostra	Volume pipetado (mL)	Volume total (mL)	Absorbância a 650 nm	Teor teórico de Fósforo (mg)
1	0,0	50,0	0,003	0,00
2	1,0	50,0	0,058	0,01
3	2,0	50,0	0,113	0,02
4	6,0	50,0	0,203	0,06
5	8,0	25,0	0,498	0,16
6	8,0	50,0	0,258	0,08
7	10,0	13,4	0,966	0,37
8	10,0	25,0	0,462	0,20
9	10,0	50,0	0,244	0,10

Segundo a Lei de Lambert-Beer, a dependência entre a concentração de fósforo e a absorbância obtida por espectrofotometria é linear. Portanto, foi ajustada aos dados da Tabela 20 a reta representada pela Equação 31, com coeficiente R^2

igual a 0,97.

$$\text{Absorbância} = (2,63 \pm 0,06) * \text{Teor de fósforo teórico (mg)} \quad (31)$$

Com a curva padrão, foi possível o cálculo da quantidade de fósforo em cada amostra pela Equação 25. Sabendo-se a massa inicial de cada uma dessas amostras, calculou-se a porcentagem mássica de fósforo obtida experimentalmente em cada caso, de acordo com a Tabela 21. Os valores descritos na coluna “Dissolução” referem-se às diferentes multiplicações do volume original de solvente, necessárias para que a absorbância se encaixasse no intervalo aceitável para medição no espectrofotômetro, ou seja, entre 0,1 e 0,9.

TABELA 21 – Teores mássicos de fósforo obtidos por espectrofotometria nas amostras avaliadas

Descrição	Massa da amostra inicial (g)	Absorbância	Dissolução	Quantidade de fósforo (mg)	Teor mássico de fósforo (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)
BRANCO	0	0,011	1	0,004	-	0,009	0,007
BRANCO	0	0,038	1	0,014	-		
Óleo ext. Etanol	1,0029	0,584	2	0,444	1,314	1,346	0,046
Óleo ext. Etanol	1,0060	0,614	2	0,467	1,378		
<i>Chlorella</i> bruta	1,0079	0,621	2	0,472	1,392	1,391	0,011
<i>Chlorella</i> bruta	1,0121	0,628	2	0,478	1,402		
<i>Chlorella</i> bruta	1,0037	0,613	2	0,466	1,379		

Os teores mássicos de fósforo encontrados com a AOCS Ca 12-55 para as amostras avaliadas mostraram que, com 90% de confiança ($p > 0,1$), não há diferença estatística entre o teor encontrado para a *Chlorella* bruta e o teor encontrado no óleo extraído com etanol. Isso é uma boa evidência de que os fosfolipídeos são fortemente solubilizados por solventes polares como aquele que foi utilizado no experimento de extração, conforme já era previsto pela Tabela 4. Os teores de fósforo encontrados são muito maiores que aqueles descritos pela ANP como permitidos para o biodiesel comercializado no país (10 mg / kg) (ANP, 2012), evidenciando a necessidade da etapa da degomagem para retirada da fração não esterificável destes compostos.

Referência anterior da literatura revela valores de porcentagem mássica de fósforo de mesma magnitude em relação às encontradas neste trabalho.

ANDERSEN *et al.* (1991) pesquisaram o teor de fósforo em biomassas de zooplâncton como a *Daphnia*, o *Holopedium* e a *Bosmina*, encontrando teores entre 0,5 e 1,7% em relação à massa seca.

A quantidade de fosfatos necessária ao cultivo de microalgas é um tema que gera polêmica em relação ao potencial energético desta fonte, sendo uma das grandes questões a serem resolvidas num futuro breve. Isso porque estes são alguns dos principais nutrientes necessários para produção em escala, e os números referentes à produção mundial atual (140 milhões de toneladas) teriam de ser no mínimo triplicados para possibilitar a produção de biocombustíveis em larga amplitude a partir de microalgas. Possivelmente estes nutrientes teriam de surgir a partir de uma rota alternativa à retirada em rocha fosfática. Um estudo simplificado desta condição é apresentado por RHODES (2012). Este mesmo autor referencia o valor de 0,895% para o teor de fósforo elementar em amostras de *Chlorella* seca, valor que também se situa na mesma ordem de grandeza daquele obtido neste trabalho.

4.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES NOS ÓLEOS EXTRAÍDOS

Através da AOCS H 12-52, foi preparada solução de hidróxido de sódio com normalidade igual a 0,1024 e desvio padrão entre amostras de 0,0006. Para a titulação (até pH predefinido através de etanol puro) das amostras de óleo extraídas, foram necessários os seguintes volumes de solução de NaOH em titulador automático, conforme Tabela 22.

TABELA 22 – Teores de acidez e de ácido palmítico estimados para as amostras de óleo extraído de *Chlorella pyrenoidosa*

Amostra	Massa óleo (g)	Volume de NaOH para titulação (mL)	Teor estimado em ácido palmítico (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Teor de acidez (mg de KOH / g)
1	0,8889	9,90	32,17%	32,40	0,32	0,6402
2	0,8819	9,85	32,26%			0,6420
3	0,8816	10,0	32,76%			0,6520

Segundo norma vigente da ANP, o biodiesel comercializado no país deve ter índice de acidez máximo de 0,50 mg KOH / g óleo (ANP, 2012). O processo da

transesterificação é o mais utilizado industrialmente para produção de biodiesel, e diferentemente do que acontece no Método laboratorial de Hartman-Lago, apenas os triacilgliceróis são facilmente convertidos através dele (FRANCO *et al.*, 2013). Faz-se necessária mais uma vez, portanto, a etapa de purificação e degomagem industrial do óleo bruto extraído, pois o teor de acidez experimental deste óleo foi superior ao da norma vigente.

Os valores encontrados para teor estimado de ácido palmítico (Equação 26) e teor de acidez estão no mesmo nível de grandeza daqueles obtidos por GIRISHA *et al.* (2014), que analisou amostras de *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Botryococcus sp.*, obtendo para a primeira teor de 30,9% em massa para ácido palmítico (por cromatografia gasosa com FID) e 0,41 para o teor de acidez.

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS EM *CHLORELLA* E EM SEUS ÓLEOS

Os resultados obtidos após medição de absorbâncias das amostras a 649 e 665 nm estão expressos na Tabela 23. A concentração das clorofilas foi determinada através da Equação 27, enquanto que o cálculo do teor mássico de clorofilas nas amostras seguiu a Equação 28. Algumas amostras foram descartadas por diferirem demais das tendências apresentadas pelos outros dados correspondentes aos mesmos casos de estudo.

O gráfico da Figura 18 ilustra os valores médios para os teores mássicos de clorofilas encontrados para cada caso da Tabela 23, bem como os desvios inerentes a cada medida.

Os resultados mostram que, com 90% de confiança ($p \leq 0,1$), há diferença estatística entre os teores de clorofilas presentes na microalga bruta e aqueles extraídos por solventes. Isso mostra que este pigmento tem alta afinidade tanto por solventes polares, tanto por apolares, tendo maior concentração nos óleos extraídos do que na matriz sólida inicial. Este resultado é inclusive perceptível visualmente, pois o óleo extraído com qualquer um dos solventes aqui utilizados apresentava cor verde intensa, enquanto que a matriz sólida restante após extração e secagem não apresentava cor tão vívida quanto a amostra original. A excessiva extração de clorofilas demanda processos de remoção (neutralização) melhores.

TABELA 23 – Resultados do experimento de determinação de teor de clorofila em amostras de *Chlorella* bruta e em seus óleos extraídos

Amostra	Caracterização	Solvente	Massa (µg)	Absorbância a 649 nm	Absorbância a 665 nm	Clorofilas (a + b) (µg / mL)	Teor mássico de clorofila (%)
1	Microalga bruta	-	55100	0,236	0,462	7,16182	0,65
2	Microalga bruta	-	52000	0,192	0,378	5,84034	0,56
3	Microalga bruta	-	53000	0,206	0,405	6,26257	0,59
4	2 horas extração	Etanol	67000	0,201	0,389	6,07077	1,81
5	2 horas extração	Etanol	65500	0,260	0,511	7,90315	2,41
6	2 horas extração	Etanol	55100	0,252	0,492	7,63884	2,77
7	4 horas extração	Etanol	55700	0,212	0,409	6,39469	2,87
8	4 horas extração	Etanol	52400	0,177	0,351	5,40039	2,58
9	4 horas extração	Etanol	31800	0,146	0,279	4,38667	3,45
10	2 horas extração	Hexano	44700	0,176	0,464	6,11152	2,73
11	4 horas extração	Hexano	53200	0,314	0,819	10,84663	2,45
12	4 horas extração	Hexano	23100	0,171	0,440	5,86812	3,05
13	2 horas extração	E:H 2:1 v/v	51900	0,266	0,551	8,26747	3,98
14	2 horas extração	E:H 2:1 v/v	62800	0,324	0,679	10,12083	4,03
15	2 horas extração	E:H 2:1 v/v	51900	0,296	0,615	9,21187	4,44
16	4 horas extração	E:H 2:1 v/v	54100	0,236	0,496	7,38112	4,09
17	4 horas extração	E:H 2:1 v/v	57300	0,259	0,540	8,07248	4,23

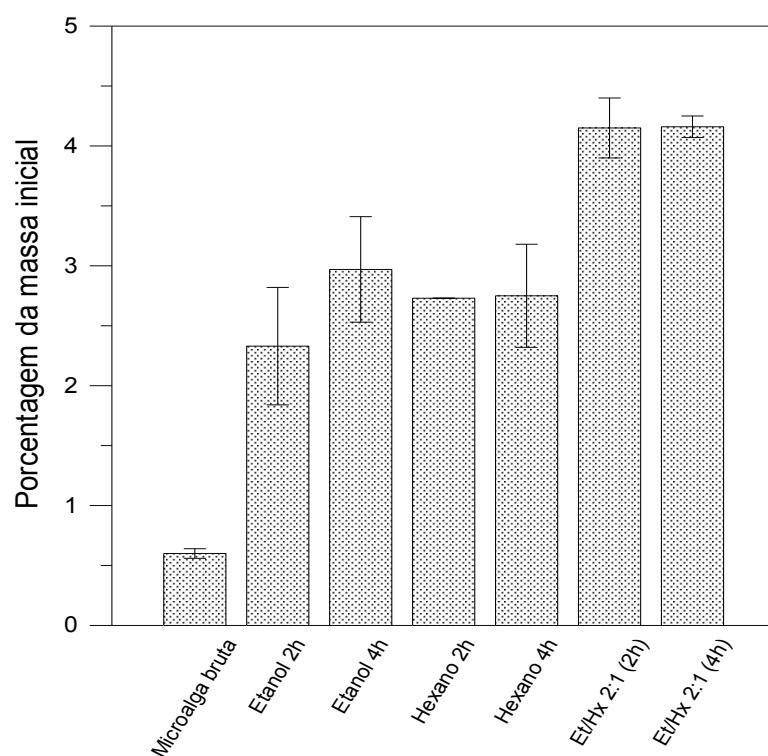


FIGURA 18 – Teores mássicos de clorofilas a + b para cada caso estudado

As concentrações de clorofilas (em $\mu\text{g} / \text{mL}$) obtidas para amostras de *Chlorella* bruta na Tabela 23 são da mesma ordem de grandeza que aquela obtida por GIRISHA *et al.* (2014) cujo valor é de $8,52 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Não houve diferença estatística ($p > 0,1$) entre os teores de clorofilas obtidos para diferentes tempos de extração nos diferentes solventes, indicando que este pigmento não é extraído em tempos particulares do fenômeno.

Não houve diferença estatística também para os teores obtidos por etanol ou por hexano, sugerindo que tais clorofilas não tem afinidade específica por solventes polares ou apolares. Esse fato chamou a atenção, e foram feitos testes combinando os dois solventes supracitados. E os resultados obtidos mostram que, com 90% de confiança ($p \leq 0,1$) há diferença entre os valores obtidos pelos solventes puros (que são menores) e os obtidos para este caso. Esse fator de resposta não teve o estudo aprofundado por estar fora do escopo principal, porém é provável que existam frações de clorofila com maior afinidade polar, e também frações com afinidade apolar mais destacada, que neste caso foram ambos extraídos ao mesmo tempo.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A aplicação dos ciclos de pressão hidrostática (HPCE) aumentou em cerca de 30% a eficiência no equilíbrio para a extração de lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, usando etanol como solvente, quando da utilização de RMM 0,096. Foi mais uma aplicação para a qual esta técnica propiciou resultados satisfatórios, dentre outros já documentados na literatura. Apesar de não apresentar fatores de resposta melhores que os de outras técnicas modernas (como a extração por ultrassom, conforme Tabela 6), a HPCE se caracteriza pelo baixo custo de implementação e manutenção. Inserido dentro da perspectiva de utilização das microalgas como matéria-prima de biocombustíveis (em especial o biodiesel) num futuro próximo, este estudo atingiu seu fim, demonstrando vantagens e desvantagens pendentes à técnica.

Através da avaliação da retenção de óleos na matriz sólida, descobriu-se que a fase admitida como “inerte” é capaz de adsorver frações de óleo e de solvente. Além disso, a hipótese de que $X_{ae} = X_{ie}$, geralmente assumida em dimensionamentos, não é válida para a extração nas condições propostas.

Os experimentos de caracterização dos óleos extraídos de *Chlorella pyrenoidosa* revelaram boa conversão em ésteres pelo Método de Hartman-Lago, sendo esta grandeza maior para os óleos extraídos por etanol que por hexano. Como a porcentagem mássica de lipídeos extraídos por etanol também foi maior em todas as técnicas executadas, ele foi selecionado como melhor solvente para o caso estudado.

Os teores de fósforo e de clorofilas em óleos extraídos da microalga mostraram-se elevados, evidenciando a importância dos processos de degomagem dos óleos brutos antes da transesterificação industrial. As clorofilas, inclusive, apresentaram maior concentração nos óleos extraídos que na biomassa bruta.

O uso mais intensivo de microalgas para fins energéticos dependerá de vários fatores técnicos ainda não totalmente solucionados. Mas dependerá principalmente de fatores econômicos, como a disponibilidade e os preços do diesel

e dos combustíveis derivados do petróleo, que atualmente são a matriz energética dominante em caráter global para operação de veículos de médio e grande porte.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificação da eficácia da HPCE para outras matrizes provedoras de óleos esterificáveis;
- Verificação dos efeitos da HPCE com solventes apolares como o hexano;
- Dimensionamento das colunas de extração para *Chlorella* através dos diagramas de McCabe-Thiele e Ponchon-Savarit;
- Exploração de outros materiais adsorventes para remoção de clorofilas dos óleos extraídos de microalgas.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 10/05/2015.
- 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.
- AHMAD, A. L. *et al.* Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584-593, doi:10.1016/j.rser.2010.09.018, 2011.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X.; Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, p. 3402-3410, 2011.
- AMIN, S.; Review on biofuel oil and gas production process from microalgae. **Energy Conversion and Management**, 30, 1834, 2009.
- ANDERSEN, R. A. Algal Culturing Techniques. **Elsevier Academic Press**. p. 565. 2005.
- ANDERSEN, T. HESSEN, D.O. Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. **American Society of Limnology and Oceanography**, Inc. Vol. 36 (4), págs 807-814. 1991.
- ANDRICH, G.; ZINNAI, A.; NESTI, U.; VENTURI, F.; FIORENTINI, R.; Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Acta Aliment Hung**, p.35, 195–203, 2006.
- AZEREDO, V.B.S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. Dissertação de Mestrado em Planejamento Energético. **COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2012.

- BABENKO, Y. I.; IVANOV, E. V.; MARKOVA, A. A. Convective Extraction from a Porous Particle under the Effect of Point Pressure Pulses. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**. Vol. 43, No. 2, pp. 182–186. 2009.
- BABENKO, Y. I.; IVANOV, E.V. Elementary Models of Extraction from Porous Particles under the Action of Pressure Pulses. **Russian Journal of Applied Chemistry**, Vol. 78, No. 9, pp. 1462-1467. 2005.
- BAHADAR, A.; KHAN, M. B. Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 128-148, 2013.
- BAN-WEISS G.A, CHEN J.Y, BUCHHOLZ B.A, DIBBLE R.W. A numerical investigation into the anomalous slight NO_x increase when burning biodiesel; A new (old) theory. **Fuel Processing Technology** ,88, 659–667, 2007.
- BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som(l): influência do ultra-som na química. **Química Nova**, 15, 302, 1992.
- BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de Spirulina platensis (Arthrospira platensis) para alimentação humana**. Dissertação de Mestrado, 2010.
- BASOVA, M.M.; Fatty acid composition of lipids in microalgae. **Journal International on Algae**, p.33, 2005.
- BATISTA, G. SUREK, G.A.S. BENINCÁ, C. CORAZZA, M.L. ZANOELO, E.F. Cyclic pressurization assisted extraction of lipids from microalgae for biodiesel production: Non-equilibrium and equilibrium data. **Fuel** ed. 163, págs 133–138. 2016.
- BAUMGARDT, F. J. L.; **Extração de óleo de microalgas com fluidos pressurizados e avaliação de sua conversão em monoésteres graxos**. Tese de mestrado, UFPR-Curitiba, 2013.
- BECKER, E.W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. **Cambridge University Press**. 1994.
- BEHRENS, P. W.; KYLE, D.J.; Microalgae as a source of fatty acids. **Journal of Food Lipids**, p.3, 259, 1996.

- BERK, Z. Food Process Engineering and Technology. **Food Science and Technology**, International Series. Elsevier Inc, Second Edition, p. 2 87 – 310. EUA, 2013.
- BJERK, T. R. **Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental. Universidade de Santa Cruz do Sul. 2012.
- BLIGH, E. G; DYER, W. J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Journal do Biochemistry and Physiology**, p.37, 911, Canadian, 1959.
- BOROWITZKA, M., BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J.; Microalgal Biotechnology. **Cambridge University Press**: p.257-287, Cambridge, 1998.
- BRADLEY, D.W., HESS, R.A., TAO, F., SCIABA-LENTZ, L., REMALEY, A.T., LAUGHARN Jr., J.A., MANAK, M., 2000. Pressure cycling technology: a novel approach to virus inactivation in plasma. **Transfusion** 40, 193–200. 2000.
- BRANDALIZE, M. V. **Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFPR. Curitiba, 2014.
- BREITMAN, C. S.; HSU, J. T.; Microalgae cultivation using photobioreactors for biodiesel production. **Recent Patents on Chemical Engineering**, p.180-194, 2010.
- 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.
- CARDOSO, W.A.; ALMEIDA, W.B.; GEREMIAS, R.; PUCKOSKI, A.G.; ANGIOLETTTO, E. Comparação entre métodos de extração de óleo de microalgas. **Revista Iniciação Científica**, v. 12, n. 1. Criciúma, Santa Catarina. 2014.
- CERTIK, M.; SHIMIZU, S.; Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, p.87, 1999.
- CHISTI, Y. Biodiesel from Microalgae. **Biotechnol Adv.** 25, Pg.294–306, 2007.

- CHISTI, Y.; Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, p.126-131, 2008.
- CHRISTIE, W. W.; Lipid analysis. **Pergamon Press**: Oxford, cap.2, 1982.
- COBELAS, M. A.; LECHADO, J. Z.; Lipids in microalgae. **Grasas y aceites**, p.40, 118, 1989.
- COHEN, Z.; Products from microalgae. Em: RICHMOND, A. **CRC Handbook of Microalgal Massa Culture**, p.421-454, 1986.
- COONEY, M.; YOUNG, G.; NAGLE, N.; Extraction of bio-oils from microalgae. **Reviews Separation and Purification**, p.38, 291–325, 2009.
- D'OCA, M. G. M., VIEGAS, C. V., LEMÕES, J. S., MIYASAKI, E. K., MORÓN-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C.; Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, 2011.
- DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A.; Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v.32, p.776-792, 2009.
- DANTAS, D.M.M.; DRUMMOND, A.R.F.; SANTOS, L.B.G.; SANTOS, F.K.; BEZERRA, R.S.; GÁLVEZ, A.O. Extração de óleo de microalga utilizando ultrassom com diferentes solventes visando a produção de biodiesel. **Congresso Brasileiro de Mamona & Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas**. Anais de Inclusão Social e Energia, p 1900-1904. João Pessoa. 2010.
- DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, doi:10.1590/S0103-84782006000600050, 2006.
- DHYANA B., POTTER, B. A.; *Chlorella*: the Emerald food. Livro I - **The Chlorella Story**, 1984.
- FAGGION, H. BENINCÁ, C. VOLL, F.A.P. ZANOELO, E.F. Phase equilibrium diagrams for the system water, inert and solutes from mate (*Ilex paraguariensis*) leaves at constant temperature and cyclic pressurization. **Journal of Food Engineering**. nº169, págs. 79-84. 2015.

- FERREIRA, F. M.; **Equilíbrio de Fases em Altas Pressões do Ácido Láurico e Metanol em CO₂**. Dissertação de mestrado – PPGEQ – UFPR, 2010.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY G.H.S.; A simple method for isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, 497, 1957.
- FONTANA, J.D. Biodiesel: para leitores de 9 a 90 anos. Editora UFPR. Curitiba, 2011.
- FORMATO, A.; GALLO, M.; IANNIELLO, C.; MONTESANO, D.; NAVIGLIO, D. Supercritical fluid extraction of α - and β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid-liquid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 84, p. 113 – 120, 2013.
- FRANCO, C. L. A.; PINHEIRO, L. I.; CRUZ, S. R.; TEIXEIRA, L. L. M. C.; NETO, A. A. J.; MENEZES, S. R. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, nº 3, p. 437-448. São Paulo, 2013.
- FUA, C. C.; HUNGB, T.C.; CHENA, J.Y.; SUC, C.H.; WU, W.T.; Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. **Bioresource Technology**, p.22- 29, 2010.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H.; Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal Bioscience and Bioengineering**, p.405, 2001.
- GIRISHA, S.T. RAVIKUMAR, K. GIRISH, V. MRUNALINI, B.R. Growing of *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Botryococcus* in sewage water for biodiesel production. **Applied Science Research**, 6 (1):131-138. 2014.
- GOMES, C. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Embrapa**. Disponível em:<www.cnpso.embrapa.br/imprcon.htm> Acesso em: 15/12/2012.
- GREENWELL, H. C., LAURENS, L. M. L., SHIELDS, R. J., LOVITT, R. W., FLYNN, K. J.; Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, p.703–726, 2010.

- GRESSLER, P. D. **Avaliação da eficiência de *Desmodesmus Subspicatus* (R.Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt (chlorophyceae) cultivada em Fotobiorreator tubular com efluente da ETE-unisc, visando biorremediação e obtenção de energia.** Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-Rio grande do Sul - [S.I.]. 2011.
- GRIMA, M.E.; MEDINA R.A.; GIMENEZ, G. A.; PEREZ, S.J.A.; Camacho, G. G.; Sánchez, G.J.L.; Comparasion between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of American Oil Chemists' Society**, 71, 955, 1994.
- GROSS, V.;CARLSON, G.; KWAN, A.T.; SMEJKAL, G.; FREEMAN, E.; IVANOV, A. R.; LAZAREV, A. Tissue Fractionation by Hydrostatic Pressure Cycling Technology: The Unified Sample Preparation Technique for Systems Biology Studies. **Journal of Biomolecular Techniques : JBT**. PP 189-199. 2008.
- 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.
- HANSON, S. W. F.; OLLEY, J.; Application of the Bligh & Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. **Journal Biochemistry**, p.89, 101, 1963.
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K.; Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p.1037–1047, 2010.
- HENDERSON, R. *et al.* The impact of algal properties and pre-oxidation on solid – liquid separation of algae. **Water research**, v. 42, n. 8-9, p. 1827 - 1845, doi:10.1016/j.watres.2007.11.039, 2008.
- HOLANDA, L.R.; RAMOS, F.S. Análise da viabilidade econômica da energia elétrica gerada através das microalgas. **Revista eletrônica Sistemas & Gestão**. Edição 6, pp 327-346. 2011.
- HOLMAN, J.P. Experimental Methods for Engineers. 8º ed. **McGraw-Hill**. 2012.
- HU, Q.; ZHANG, C. W.; SOMMERFELD, M.; Biodiesel from Algae. **Annual Meeting of the Phycological Society of America**, 2006.

- HUANG¹, G.H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, Gu.; Biodiesel production by microalgae biotechnology. **Applied Energy**, 2009.
- HUANG², J. *et al.* A comparison of the role of two blue – green algae in THM and HAA formation. **Water Research**, v. 43, n. 12, p. 3009-3018, doi:10.1016/j.watres.2009.04.029, 2009.
- IEA / OCDE (Agência Internacional de Energia / Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico). **World Energy Outlook 2010**. 2010.
- KHAN, S. A. e OTHERS. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361–2372, doi:10.1016/j.rser.2009.04.005, 2009.
- 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.
- KOTOVICZ, V. **Extração rápida de compostos solúveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por ciclos de compressão e descompressão hidrostática: experimentos, modelagem e simulação**. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- KOTOVICZ, V. ZANOELO, E. F.; Hydrostatic pressure cycling extraction of soluble matter from mate leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 656 – 665, 2013.
- KUS, M.M.M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 68(1):12-20, 2009.
- 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.

- LI, Y.; NAGHDY, F.G.; GARG, S.; ADARME-VEGA, T.C.; THURECHT, K.J.; GHAFOR, W.A.; TANNOCK, S.; SCHENK, P.M. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, 13:14. 2014.
- LIANG, Y. C.; MAY, C. Y.; FOON, C. S.; NGAN, M. A.; HOCK, C. C.; BASIRON, Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, v. 85, n. 5, march, 2006.
- LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B.. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717 – 4722, 2008.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1ª ed. São Paulo: Rima, 606 p. 2006.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E.; Where is supercritical fluid extraction going? **Analytical Chemistry**, p.369, 1998.
- MAGALHÃES, K.F. **Investigação dos fluoróforos presentes no biodiesel produzido a partir de diferentes óleos vegetais**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental. UFGD, Dourados, MS. 2012.
- MARQUES, J.G.; SOARES, A.T.; D'ALESSANDRO, E.B.; COSTA, D.C.; SILVA, L.F.; TAVARES, M.G.O.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Avaliação do perfil de pigmentos na biomassa seca e no biodiesel produzido a partir das microalgas *Acutodesmus sp.* e *Chlorella sp.* **2º Simpósio de Bioenergia e Biocombustíveis do Mercosul**. 2014.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Portugal, v. 14, p. 217-232, 2009.
- MATA, T. M.; MARTINS, A.; CAETANO, N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p.217, 2010.
- MENDES, R. L., COELHO, J. P., FERNANDES, H. L., MARRUCHO, I.J., CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M., PALAVRA, A. F.; Applications of supercritical carbon dioxide extraction to microalgae and plants. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 62, 53, 1995.

- MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G. *et al.* Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Chemistry** p.1357–1367, 2007.
- MILINSK, M.C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. Tese de Doutorado em Química. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá. 2007.
- MILINSK, M.C.; MATSUSHITA, M. VISENTAINER, J.V. DIAS, L.F. YAMAGUCHI, M.M. PEDRÃO, M.R. SOUZA, N.E. Influence of the esterification method on the quantification of olive oil fatty acids. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 139-150, 2011.
- MOHEIMANI, N. R.; **The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation**. 252f. Tese de Doutorado. Murdoch University, Perth, Australia, 2005.
- MOLINA G. *et al.*; Downstream processing of cellmass and products. Citado em: RICHMOND, A.; Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford: Blackwell Science**, p.215-251, 2004.
- MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMÉNEZ, G. A.; Recovery of algal PUFAs. Citado em: Cohen, Z. **Chemicals from microalgae**. Londres, 1999.
- MULDER, J. P. Micro-Algas: A nova Agricultura. **Mimeo**, Recife/PE: UFPE, 2009.
- NAVIGLIO, D. Naviglio's Principle and Presentation of an Innovative Solid-Liquid Extraction Technology: Extractor Naviglio®. **Analytical Letters**, v. 36, p. 1647 – 1659, 2003.
- NAVIGLIO, D. **Rapid and dynamic solid-liquid extractor working at high pressures and low temperatures for obtaining in short times solutions containing substances that initially were in solid matrixes insoluble in extracting liquid**. Italian Patent No. 1.303.417, November 6, 2000.

- NAVIGLIO, D.; FERRARA, L.; FORMATO, A.; GALLO, M. Efficiency of conventional extraction technique compared to rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE) in the preparation of bitter liquors and elixirs. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 4. P. 14 – 22, 2014.
- NAVIGLIO, D.; PIZZOLONGO, F.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, B.; ARAGÓN, A.; SANTINI, A. Extraction of pure lycopene from industrial tomato waste in water using the extractor Naviglio ®. **African Journal of Food Science**, v. 2, p. 37 – 44, 2008, e Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 88, p. 2414 – 2420, 2008.
- NAVIGLIO, D.; PIZZOLONGO, F.; ROMANO, R.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, B.; SANTINI, A. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the Naviglio extractor® for the production of lemon liquor. **African Journal of Food Science**, v. 1, p. 42 – 50, 2007.
- NELSON, J. G.; Em Analyses of fats, oils and lipoproteins; Perkins, E. G., ed.; **American Oil Chemists' Society**: Champaign, cap. 2, 1991.
- OH, H.M.; AHN, C.Y.; JUN, S.Y.; LEE, J.Y.; YOO, C.; Comparasion of several methods of effective lipid extaction from microalgae. **Bioresource Technology**, 101, S75, 2010.
- OKUBARA, P.A., LI, C.Q., SCHROEDER, K.L., SCHUMACHER, R.T., LAWRENCE, N.P. Improved extraction of rhizoctonia and pythiu DNA from wheat roots and soil samples using pressure cycling technology. **Canadian Journal of Plant Pathology** 29, 304–310. 2007.
- OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus sp.* em efluente de bovinocultura biodigerido**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE. Universidade Federal do Paraná, 2013.
- ORTÍZ, R. W. P.; **Estudo teórico e experimental da extração de café com ciclos de compressão e descompressão hidrostática**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR. Curitiba, 2015.
- PATRÍCIO, J.S. HOTZA, D. DE NONI JÚNIOR, A. Argilas adsorventes aplicadas à clarificação de óleos vegetais. **Revista Cerâmica**, nº 60. Págs. 171-178. 2014.

- PEQUENO, M.A.G.; SOARES, A.T.; SASSI, K.K.B.; SILVA, D.D.; SOUZA, A.G. Avaliação do potencial do óleo da microalga cultivada *Chlorella sp.* Por cromatografia gasosa. **Revista Analytica**, nº 57. 2012.
- PÉREZ, Homero E. B. Biodiesel de Microalgas, **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN**, p.1 - 19, 2007.
- PERNET, F.; TREMBLAY, R.; Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters. **Lipids**, 38(11), 1191, 2003.
- PULZ, O. GROSS. W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology** Ed. 65. Pág. 635–648. 2004.
- QUADROS, D.P.C.; CHAVES, E.S.; SILVA, J.S.A.; TEIXEIRA, L.S.G.; CURTIUS, A.J.; PEREIRA, P.A.P. Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade. **Revista Virtual de Química**, 3 (5), págs. 376-384. 2011.
- RAMAZANOV, A.; RAMAZANOV, Z.; Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. **Phycological Research**, p.255, 2006.
- RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. k.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 31, p. 28-37. 2003.
- RHODES. C. **Why Algal Biofuels May Never Hold the Key to the Future**. Disponível em <<http://oilprice.com/Alternative-Energy/Biofuels/Why-Algal-Biofuels-May-Never-Hold-the-Key-to-the-Future.html>>. Publicado em 2012. Acesso em 19/10/2015.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science**, 2004.
- RITTNER, H. Extraction of vegetable oils with ethyl alcohol. **Oléagineux**, v. 47, n.1, p. 29, 1992.
- ROCHA, J.; GARCIA, J. e HENRIQUES, M. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 237-242, doi:10.1016/S1389-0344(03)00061-3, 2003.

- RODRIGUES, C. E. C.; OLIVEIRA, R. Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol. **International Journal of Food Science Technology**, v. 45, p. 813–820, 2010.
- SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A., *et al.*; Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. **Journal of Food Engineering** p.240–253, 2009.
- SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M.. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 23(Supl), p. 17 – 21, dez. 2003.
- SCHMIDT, C. J. B.. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. Citado em: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 1. ed. La Paz: **Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR)**, p 1 – 16, 2007.
- SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products: Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.361-371, 2002.
- SILVA, E.R.; CORRÊA, M.B.; OLIVEIRA, E.E.M.; ALVES, A.B. Uso de Membranas Poliméricas de Ultrafiltração na Remoção de Clorofila do Extrato Vegetal. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2006.
- 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.
- SILVA, L.F.F.; BOCK, F.C.; MARDER, L.; SCHNEIDER, R.C.S. Otimização do processo de remoção de clorofila de óleo de mamona utilizando argila bentonítica ativada com ácido. **2º Workshop em Sistemas e Processos Industriais**, Santa Cruz do Sul, RS. 2013.
- STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755. 2005.

- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de Triacilgliceróis em combustíveis materiais. Poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, 30(3), 667, 2007.
- SUREK, G.A.S. BATISTA, G. CAMACHO, F.P. BENINCÁ, C. BERGAMASCO, R. CARDOZO-FILHO, L. ZANOELO, E.F. Extração de lipídeos de cianobactérias (*Microcystis protocystis*) assistida por pressurização cíclica. **XXXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (ENEMP)**. Universidade Federal de São Carlos. 2015.
- SZABO, Z., GUTTMAN, A., KARGER, B.L., 2010. Rapid release of n-linked glycans from glycoproteins by pressure-cycling technology. **Analytical Chemistry** 82, 2588–2593. 2010.
- 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.
- TAO, F.; LI, C.; SMEJKAL, G.; LAZAREV, A. ; LAWRENCE, N.; SCHUMACHER, R.T. Pressure Cycling Technology (PCT) Applications in Extraction of Biomolecules from Challenging Biological Samples. **High Pressure Bioscience and Biotechnology** (Proceedings of the 4th International Conference). Vol. 1. pp 166-173. 2007.
- TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E.; Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Instituto Nacional de Tecnologia**. Rio de Janeiro, 2011.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M.; Algal: An Introduction to Phycology. **Cambridge University Press**: Cambridge, 1995.
- VIÊGAS, C.C. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. Dissertação de Mestrado. Escola de Química e Alimentos, FURG. 2010.
- XU, H.; MIAO, X.; WU, Q.; J.; High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Department of Biological Science and Biotechnology**, p.499, 2006.

- YANG, F. XIANG, W. SUN, X. WU, H. LI, T. LONG, L. A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum* sp. at Room Temperature. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology. **Marine Drugs**. 2014.
- ZY, W.; JIANG, Y.; CHEN, F.; Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, 21, 273, 2003.

ANEXOS

ANEXO I – Tabela da Distribuição t de Student

Distribuição t de Student (Bicaudal e Unicaudal)

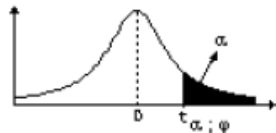


TABELA - Distribuição t de Student (Unicaudal e Bicaudal)

 φ = graus de liberdade

α	25%	10%	5%	2,5%	1%	0,5%
φ						
1	1,0000	3,0777	6,3138	12,7062	31,8207	63,6574
2	0,8165	1,8856	2,9200	4,3027	6,9646	9,9248
3	0,7649	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8409
4	0,7407	1,5332	2,1318	2,7764	3,7469	4,6041
5	0,7267	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0322
6	0,7176	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074
7	0,7111	1,4149	1,8946	2,3646	2,9980	3,4995
8	0,7064	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554
9	0,7027	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498
10	0,6998	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693
11	0,6974	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058
12	0,6955	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545
13	0,6938	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123
14	0,6924	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768
15	0,6912	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467
16	0,6901	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208
17	0,6892	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982
18	0,6884	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784
19	0,6876	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609
20	0,6870	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453
21	0,6864	1,3232	1,7207	2,0796	2,5177	2,8314
22	0,6858	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188
23	0,6853	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073
24	0,6848	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7969
25	0,6844	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874
26	0,6840	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787
27	0,6837	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707
28	0,6834	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633
29	0,6830	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564
30	0,6828	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500
31	0,6825	1,3095	1,6955	2,0395	2,4528	2,7440
32	0,6822	1,3086	1,6939	2,0369	2,4487	2,7385
33	0,6820	1,3077	1,6924	2,0345	2,4448	2,7333
34	0,6818	1,3070	1,6909	2,0322	2,4411	2,7284
35	0,6816	1,3062	1,6896	2,0301	2,4377	2,7238
36	0,6814	1,3055	1,6883	2,0281	2,4345	2,7195
37	0,6812	1,3049	1,6871	2,0262	2,4314	2,7154
38	0,6810	1,3042	1,6860	2,0244	2,4286	2,7116
39	0,6808	1,3036	1,6849	2,0227	2,4258	2,7079
40	0,6807	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045
41	0,6805	1,3025	1,6829	2,0195	2,4208	2,7012
42	0,6804	1,3020	1,6820	2,0181	2,4185	2,6981
43	0,6802	1,3016	1,6811	2,0167	2,4163	2,6951
44	0,6801	1,3011	1,6802	2,0154	2,4141	2,6923
45	0,6800	1,3006	1,6794	2,0141	2,4121	2,6896
46	0,6799	1,3002	1,6787	2,0129	2,4102	2,6870
47	0,6797	1,2998	1,6779	2,0117	2,4083	2,6846
48	0,6796	1,2994	1,6772	2,0106	2,4066	2,6822
49	0,6795	1,2991	1,6766	2,0096	2,4049	2,6800
50	0,6794	1,2987	1,6759	2,0086	2,4033	2,6778
51	0,6793	1,2984	1,6753	2,0076	2,4017	2,6757
52	0,6792	1,2980	1,6747	2,0066	2,4002	2,6737
53	0,6791	1,2977	1,6741	2,0057	2,3988	2,6718
54	0,6791	1,2974	1,6736	2,0049	2,3974	2,6700
55	0,6790	1,2971	1,6730	2,0040	2,3961	2,6682
56	0,6789	1,2969	1,6725	2,0032	2,3948	2,6665
57	0,6788	1,2966	1,6720	2,0025	2,3936	2,6649
58	0,6787	1,2963	1,6716	2,0017	2,3924	2,6633
59	0,6787	1,2961	1,6711	2,0010	2,3912	2,6618
60	0,6786	1,2958	1,6706	2,0003	2,3901	2,6603
61	0,6785	1,2956	1,6702	1,9996	2,3890	2,6589
62	0,6785	1,2954	1,6698	1,9990	2,3880	2,6575
63	0,6784	1,2951	1,6694	1,9983	2,3870	2,6561
64	0,6783	1,2949	1,6690	1,9977	2,3860	2,6549
65	0,6783	1,2947	1,6686	1,9971	2,3851	2,6536
66	0,6782	1,2945	1,6683	1,9966	2,3842	2,6524
67	0,6782	1,2943	1,6679	1,9960	2,3833	2,6512
68	0,6781	1,2941	1,6676	1,9955	2,3824	2,6501
69	0,6781	1,2939	1,6672	1,9949	2,3816	2,6490
70	0,6780	1,2938	1,6669	1,9944	2,3808	2,6479
71	0,6780	1,2936	1,6666	1,9939	2,3800	2,6469
72	0,6779	1,2934	1,6663	1,9935	2,3793	2,6459
73	0,6779	1,2933	1,6660	1,9930	2,3785	2,6449
74	0,6778	1,2931	1,6657	1,9925	2,3778	2,6439
75	0,6778	1,2929	1,6654	1,9921	2,3771	2,6430
76	0,6777	1,2928	1,6652	1,9917	2,3764	2,6421
77	0,6777	1,2926	1,6649	1,9913	2,3758	2,6412
78	0,6776	1,2925	1,6646	1,9908	2,3751	2,6403
79	0,6776	1,2924	1,6644	1,9905	2,3745	2,6395
80	0,6776	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387
81	0,6775	1,2921	1,6639	1,9897	2,3733	2,6379
82	0,6775	1,2920	1,6636	1,9893	2,3727	2,6371
83	0,6775	1,2918	1,6634	1,9890	2,3721	2,6364
84	0,6774	1,2917	1,6632	1,9886	2,3716	2,6356
85	0,6774	1,2916	1,6630	1,9883	2,3710	2,6349
86	0,6774	1,2915	1,6628	1,9879	2,3705	2,6342
87	0,6773	1,2914	1,6626	1,9876	2,3700	2,6335
88	0,6773	1,2912	1,6624	1,9873	2,3695	2,6329
89	0,6773	1,2911	1,6622	1,9870	2,3690	2,6322
90	0,6772	1,2910	1,6620	1,9867	2,3685	2,6316
100	0,677	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626
120	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617
∞	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

ANEXO II – Resultados experimentais obtidos para extrações à Patm e com auxílio de HPCE

1ª Corrida Experimental - 23/02/2015 - 30°C, 91,4 kPa, RMM 0,096					
Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
A1	1	2,2546	23,4970	0,00008	0,08
A2	6	2,2511	23,4989	0,00023	0,25
A3	6	2,2511	23,4989	0,00026	0,27
A4	10	2,2553	23,4928	0,00026	0,27
A5	10	2,2553	23,4928	0,00023	0,25
A6	20	2,2550	23,4941	0,00033	0,35
A7	20	2,2550	23,4941	0,00023	0,25
A8	40	2,2534	23,4987	0,00071	0,77
A9	40	2,2534	23,4987	0,00051	0,55
A10	60	2,2578	23,4946	0,00189	2,02
A11	60	2,2578	23,4946	0,00094	1,01

2ª Corrida Experimental - 25/02/2015 - 30°C, 91,4 kPa, RMM 0,096					
Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
A12	1	2,2527	23,4927	0,00034	0,36
A13	3	2,2527	23,4927	0,00068	0,73
A14	6	2,2527	23,4927	0,00031	0,33
A15	6	2,2527	23,4927	0,00033	0,36
A16	10	2,2537	23,4970	0,00111	1,18
A17	20	2,2537	23,4970	0,00068	0,73
A18	40	2,2537	23,4970	0,00115	1,23
A19	40	2,2537	23,4970	0,00110	1,18
A20	60	2,2521	23,4945	0,00077	0,82
A21	80	2,2521	23,4945	0,00238	2,56
A22	100	2,2521	23,4945	0,00189	2,03
A23	100	2,2521	23,4945	0,00199	2,14
A24	120	2,2534	23,4963	0,00426	4,57
A25	140	2,2534	23,4963	0,00366	3,93
A26	160	2,2534	23,4963	0,00355	3,81
A27	160	2,2534	23,4963	0,00324	3,48
A28	180	2,2503	23,4922	0,00393	4,23
A29	180	2,2503	23,4922	0,00334	3,59

3ª Corrida Experimental - 27/02/2015 - 30°C, 91,4 kPa, RMM 0,096

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
A30	60	2,2505	23,4970	0,00248	2,66
A31	60	2,2505	23,497	0,00184	1,97
A32	120	2,2552	23,4903	0,00311	3,34
A33	180	2,2573	23,4985	0,00347	3,72
A34	240	2,2501	23,5000	0,00483	5,19
A35	300	2,2506	23,4900	0,00541	5,83
A36	360	2,2556	23,4964	0,00546	5,87
A37	420	2,2507	23,4944	0,00654	7,04

4ª Corrida Experimental - 03/03/2015 - 30°C, 91,4 kPa, RMM 0,096

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
A38	60	2,2514	23,4949	0,00156	1,67
A39	60	2,2524	23,4949	0,00194	2,08
A40	60	2,2514	23,4949	0,00232	2,49
A41	120	2,2524	23,4922	0,00324	3,48
A42	120	2,2524	23,4922	0,00398	4,28
A43	180	2,2514	23,4931	0,00403	4,34
A44	180	2,2514	23,4931	0,00357	3,84
A45	180	2,2514	23,4931	0,00444	4,78
A46	240	2,2508	23,4989	0,00523	5,63
A47	240	2,2508	23,4989	0,00526	5,66
A48	300	2,2505	23,4917	0,00500	5,38
A49	300	2,2505	23,4917	0,00480	5,16
A50	300	2,2505	23,4917	0,00513	5,52
A51	360	2,2531	23,4980	0,00528	5,68
A52	360	2,2531	23,4980	0,00493	5,30
A53	360	2,2531	23,4980	0,00577	6,21
A54	420	2,2519	23,4961	0,00597	6,43
A55	420	2,2519	23,4961	0,00546	5,88
A56	420	2,2519	23,4961	0,00608	6,54

5ª Corrida Experimental - 05/03/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa , RMM 0,096

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
B1	20	2,2518	23,4998	0,00054	0,58
B2	40	2,2518	23,4998	0,00161	1,73

B3	60	2,2518	23,4998	0,00154	1,65
B4	60	2,2518	23,4998	0,00146	1,56
B5	80	2,2549	23,4984	0,00288	3,09
B6	100	2,2549	23,4984	0,00234	2,50
B7	120	2,2549	23,4984	0,00394	4,23
B8	120	2,2549	23,4984	0,00375	4,02
B9	140	2,2508	23,4942	0,00297	3,19
B10	160	2,2508	23,4942	0,00341	3,67
B11	180	2,2508	23,4942	0,00364	3,91
B12	180	2,2508	23,4942	0,00378	4,06
B13	220	2,2549	23,4988	0,00460	4,93
B14	240	2,2549	23,4988	0,00414	4,45
B15	240	2,2549	23,4988	0,00440	4,73
B16	260	2,2510	23,4986	0,00631	6,8
B17	280	2,2510	23,4986	0,00677	7,29
B18	300	2,2510	23,4986	0,00717	7,73
B19	300	2,2510	23,4986	0,00700	7,55
B20	320	2,2544	23,4998	0,00656	7,06
B21	340	2,2544	23,4998	0,00659	7,09
B22	360	2,2544	23,4998	0,00727	7,83
B23	360	2,2544	23,4998	0,00666	7,16
B24	380	2,2535	23,4929	0,00656	7,06
B25	420	2,2535	23,4929	0,00712	7,67
B26	420	2,2535	23,4929	0,00706	7,61

6ª Corrida Experimental - 10/03/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa , RMM 0,096

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
B27	20	2,2502	23,4975	0,00080	0,86
B28	40	2,2502	23,4975	0,00091	0,98
B29	60	2,2502	23,4975	0,00185	1,98
B30	60	2,2502	23,4975	0,00228	2,45
B31	80	2,2557	23,4967	0,00165	1,77
B32	100	2,2557	23,4967	0,00364	3,91
B33	120	2,2557	23,4967	0,00384	4,12
B34	120	2,2557	23,4967	0,00363	3,90
B35	140	2,2554	23,4932	0,00222	2,38
B36	160	2,2554	23,4932	0,00278	2,98
B37	180	2,2554	23,4932	0,00362	3,88
B38	180	2,2554	23,4932	0,00313	3,36
B39	200	2,2509	23,4988	0,00395	4,24
B40	220	2,2509	23,4988	0,00370	3,98
B41	240	2,2509	23,4988	0,00425	4,57
B42	240	2,2509	23,4988	0,00439	4,72

B43	260	2,2510	23,4947	0,00503	5,41
B44	280	2,2510	23,4947	0,00526	5,66
B45	300	2,2510	23,4947	0,00538	5,79
B46	300	2,2510	23,4947	0,00525	5,65
B47	320	2,2537	23,4961	0,00511	5,49
B48	360	2,2537	23,4961	0,00517	5,56
B49	360	2,2537	23,4961	0,00504	5,42
B50	380	2,2521	23,4936	0,00633	6,81
B51	400	2,2521	23,4936	0,00624	6,72
B52	420	2,2521	23,4936	0,00580	6,24
B53	420	2,2521	23,4936	0,00593	6,38

7ª Corrida Experimental - 23/03/2015 - 30°C, HPCE a 400 kPa , RMM 0,096

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
C1	20	2,2516	23,4942	0,00119	1,27
C2	40	2,2516	23,4942	0,00135	1,45
C3	60	2,2516	23,4942	0,00253	2,72
C4	60	2,2516	23,4942	0,00247	2,65
C5	100	2,2513	23,4938	0,00335	3,60
C6	120	2,2513	23,4938	0,00408	4,39
C7	120	2,2513	23,4938	0,00398	4,27
C8	160	2,2547	23,4947	0,00325	3,48
C9	180	2,2547	23,4947	0,00403	4,32
C10	180	2,2547	23,4947	0,00408	4,38
C11	200	2,2568	23,4924	0,00555	5,96
C12	220	2,2568	23,4924	0,00578	6,21
C13	240	2,2568	23,4924	0,00593	6,37
C14	240	2,2568	23,4924	0,00617	6,63
C15	260	2,2528	23,4962	0,00604	6,50
C16	280	2,2528	23,4962	0,00562	6,05
C17	300	2,2528	23,4962	0,00621	6,68
C18	300	2,2528	23,4962	0,00613	6,60
C19	320	2,2502	23,4979	0,00753	8,13
C20	340	2,2502	23,4979	0,00700	7,55
C21	360	2,2502	23,4979	0,00661	7,12
C22	360	2,2502	23,4979	0,00668	7,20
C23	380	2,2561	23,4944	0,00725	7,80
C24	400	2,2561	23,4944	0,00779	8,39
C25	420	2,2561	23,4944	0,00716	7,71
C26	420	2,2561	23,4944	0,00736	7,92

8ª Corrida Experimental - 25/03/2015 - 30°C, HPCE a 400 kPa , RMM 0,096					
Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
C27	20	2,254	23,4976	0,00107	1,14
C28	40	2,254	23,4976	0,00168	1,80
C29	60	2,254	23,4976	0,00200	2,14
C30	60	2,254	23,4976	0,00209	2,24
C31	80	2,2519	23,4963	0,00237	2,54
C32	100	2,2519	23,4963	0,00306	3,29
C33	120	2,2519	23,4963	0,00337	3,62
C34	120	2,2519	23,4963	0,00341	3,66
C35	140	2,2578	23,4937	0,00354	3,79
C36	160	2,2578	23,4937	0,00445	4,77
C37	180	2,2578	23,4937	0,00418	4,48
C38	180	2,2578	23,4937	0,00434	4,65
C39	200	2,2593	23,4925	0,00543	5,83
C40	220	2,2593	23,4925	0,00465	4,99
C41	240	2,2593	23,4925	0,00498	5,34
C42	240	2,2593	23,4925	0,00487	5,22
C43	260	2,2572	23,4920	0,00699	7,51
C44	280	2,2572	23,4920	0,00678	7,29
C45	300	2,2572	23,4920	0,00689	7,41
C46	300	2,2572	23,4920	0,00668	7,18
C47	320	2,2530	23,4950	0,00639	6,88
C48	340	2,2530	23,4950	0,00677	7,29
C49	360	2,2530	23,4950	0,00634	6,83
C50	380	2,2569	23,4982	0,00667	7,18
C51	400	2,2569	23,4982	0,00744	8,01
C52	420	2,2569	23,4982	0,00692	7,44
C53	420	2,2569	23,4982	0,00695	7,47

9ª Corrida Experimental - 01/04/2015 - 30°C, HPCE a 600 kPa, RMM 0,096					
Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
D1	20	2,2529	23,4955	0,00142	1,52
D2	40	2,2529	23,4955	0,00227	2,43
D3	60	2,2529	23,4955	0,00265	2,84
D4	60	2,2529	23,4955	0,00243	2,60
D5	80	2,2557	23,4959	0,00266	2,84
D6	120	2,2557	23,4959	0,00285	3,05
D7	120	2,2557	23,4959	0,00346	3,71

D8	140	2,2524	23,4937	0,00349	3,75
D9	160	2,2524	23,4937	0,00398	4,27
D10	180	2,2524	23,4937	0,00418	4,49
D11	180	2,2524	23,4937	0,00439	4,71
D12	200	2,2504	23,4917	0,00438	4,71
D13	220	2,2504	23,4917	0,00473	5,09
D14	240	2,2504	23,4917	0,00455	4,90
D15	260	2,2543	23,4975	0,00658	7,08
D16	280	2,2543	23,4975	0,00677	7,29
D17	300	2,2543	23,4975	0,00620	6,67
D18	300	2,2543	23,4975	0,00613	6,60
D19	320	2,2583	23,4936	0,00654	7,02
D20	340	2,2583	23,4936	0,00713	7,66
D21	360	2,2583	23,4936	0,00680	7,30
D22	360	2,2583	23,4936	0,00682	7,33
D23	380	2,2549	23,4988	0,00826	8,90
D24	400	2,2549	23,4988	0,00771	8,30
D25	420	2,2549	23,4988	0,00725	7,81
D26	420	2,2549	23,4988	0,00729	7,85

10ª Corrida Experimental - 08/04/2015 - 30°C, 91,4 kPa , RMM 0,149

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
E1	20	3,5036	23,4965	0,00197	1,36
E2	40	3,5036	23,4965	0,00317	2,19
E3	60	3,5036	23,4965	0,00455	3,15
E4	60	3,5036	23,4965	0,00475	3,28
E5	80	3,5045	23,4977	0,00504	3,48
E6	120	3,5045	23,4977	0,00569	3,94
E7	120	3,5045	23,4977	0,00562	3,89
E8	140	3,5087	23,4986	0,00735	5,09
E9	160	3,5087	23,4986	0,00668	4,62
E10	180	3,5087	23,4986	0,00745	5,16
E11	180	3,5087	23,4986	0,00768	5,32
E12	200	3,5021	23,4948	0,00766	5,31
E13	220	3,5021	23,4948	0,00827	5,74
E14	240	3,5021	23,4948	0,00814	5,65
E15	240	3,5021	23,4948	0,00853	5,92
E16	260	3,5050	23,4986	0,00737	5,11
E17	280	3,5050	23,4986	0,00833	5,77
E18	300	3,5050	23,4986	0,00809	5,61
E19	300	3,5050	23,4986	0,00847	5,87
E20	340	3,5064	23,4925	0,00916	6,35
E21	360	3,5064	23,4925	0,00972	6,74

E22	360	3,5064	23,4925	0,00815	5,65
E23	380	3,5090	23,4921	0,01036	7,19
E24	400	3,5090	23,4921	0,01055	7,32
E25	420	3,5090	23,4921	0,01044	7,24
E26	420	3,5090	23,4921	0,01091	7,58

11ª Corrida Experimental - 10/04/2015 - 30°C, Patm, RMM 0,202

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
F1	40	4,7575	23,4986	0,00086	0,44
F2	60	4,7575	23,4986	0,00418	2,13
F3	60	4,7575	23,4986	0,00497	2,53
F4	80	4,7522	23,4965	0,00309	1,57
F5	100	4,7522	23,4965	0,00422	2,15
F6	120	4,7522	23,4965	0,00536	2,73
F7	120	4,7522	23,4965	0,00571	2,91
F8	140	4,7506	23,4912	0,00571	2,91
F9	160	4,7506	23,4912	0,00646	3,30
F10	180	4,7506	23,4912	0,00884	4,53
F11	180	4,7506	23,4912	0,00860	4,40
F12	200	4,7529	23,4947	0,00668	3,41
F13	220	4,7529	23,4947	0,00776	3,96
F14	240	4,7529	23,4947	0,00915	4,68
F15	240	4,7529	23,4947	0,00926	4,74
F16	260	4,7559	23,4952	0,00937	4,79
F17	280	4,7559	23,4952	0,00968	4,95
F18	300	4,7559	23,4952	0,01011	5,18
F19	300	4,7559	23,4952	0,01028	5,26
F20	320	4,7516	23,4988	0,00990	5,07
F21	340	4,7516	23,4988	0,01104	5,66
F22	360	4,7516	23,4988	0,01183	6,07
F23	360	4,7516	23,4988	0,01252	6,43
F24	380	4,7502	23,4919	0,01139	5,84
F25	400	4,7502	23,4919	0,01174	6,03
F26	420	4,7502	23,4919	0,01177	6,04
F27	420	4,7502	23,4919	0,01232	6,33

12ª Corrida Experimental - 13/04/2015 - 30°C, Patm, RMM 0,255

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
G1	20	6,0013	23,4930	0,00246	0,99
G2	40	6,0013	23,4930	0,00520	2,10

G3	60	6,0013	23,4930	0,00657	2,66
G4	60	6,0013	23,4930	0,00742	3,00
G5	80	6,0006	23,4950	0,00645	2,61
G6	120	6,0006	23,4950	0,00837	3,39
G7	120	6,0006	23,4950	0,00879	3,56
G8	140	6,0030	23,4972	0,00942	3,82
G9	160	6,0030	23,4972	0,00947	3,84
G10	180	6,0030	23,4972	0,01035	4,20
G11	180	6,0030	23,4972	0,01115	4,53
G12	200	6,0002	23,4987	0,01030	4,18
G13	220	6,0002	23,4987	0,01024	4,16
G14	240	6,0002	23,4987	0,01118	4,54
G15	240	6,0002	23,4987	0,01190	4,84
G16	260	6,0050	23,4953	0,01229	4,99
G17	320	6,0009	23,4979	0,01179	4,79
G18	340	6,0009	23,4979	0,01201	4,88
G19	360	6,0009	23,4979	0,01231	5,01
G20	360	6,0009	23,4979	0,01314	5,35
G21	380	6,0006	23,4971	0,01637	6,68
G22	400	6,0006	23,4971	0,01282	5,22
G23	420	6,0006	23,4971	0,01479	6,03
G24	420	6,0006	23,4971	0,01627	6,64

13ª Corrida Experimental - 16/04/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa, RMM 0,096

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
B54	40	2,2545	23,4941	0,00049	0,52
B55	60	2,2545	23,4941	0,00234	2,51
B56	60	2,2545	23,4941	0,00238	2,55
B57	80	2,2521	23,4956	0,00231	2,47
B58	100	2,2521	23,4956	0,00218	2,34
B59	120	2,2521	23,4956	0,00374	4,01
B60	120	2,2521	23,4956	0,00400	4,30
B61	140	2,2534	23,4970	0,00321	3,44
B62	160	2,2534	23,4970	0,00401	4,31
B63	180	2,2534	23,4970	0,00483	5,19
B64	200	2,2565	23,4920	0,00483	5,18
B65	220	2,2565	23,4920	0,00520	5,59
B66	240	2,2565	23,4920	0,00590	6,34
B67	240	2,2565	23,4920	0,00600	6,44
B68	280	2,2518	23,4997	0,00555	5,97
B69	300	2,2518	23,4997	0,00620	6,68
B70	300	2,2518	23,4997	0,00714	7,69
B71	360	2,2509	23,4991	0,00563	6,06
B72	360	2,2509	23,4991	0,00607	6,54

B73	380	2,2512	23,4912	0,00735	7,92
B74	400	2,2512	23,4912	0,00809	8,73
B75	420	2,2512	23,4912	0,00774	8,35
B76	420	2,2512	23,4912	0,00783	8,45

14ª Corrida Experimental - 18/04/2015 - 30°C, Patm, RMM 0,149

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
E27	20	3,5042	23,4988	0,00048	0,33
E28	40	3,5042	23,4988	0,00120	0,82
E29	60	3,5042	23,4988	0,00323	2,23
E30	60	3,5042	23,4988	0,00383	2,64
E31	80	3,5021	23,4931	0,00318	2,20
E32	100	3,5021	23,4931	0,00480	3,32
E33	120	3,5021	23,4931	0,00479	3,31
E34	120	3,5021	23,4931	0,00555	3,84
E35	140	3,5063	23,4959	0,00601	4,16
E36	160	3,5063	23,4959	0,00548	3,79
E37	180	3,5063	23,4959	0,00764	5,29
E38	180	3,5063	23,4959	0,00764	5,29
E39	240	3,5062	23,4927	0,00691	4,78
E40	240	3,5062	23,4927	0,00715	4,95
E41	260	3,5026	23,4982	0,00813	5,64
E42	280	3,5026	23,4982	0,00806	5,59
E43	300	3,5026	23,4982	0,00902	6,26
E44	300	3,5026	23,4982	0,00930	6,46
E45	320	3,5029	23,4961	0,00901	6,25
E46	340	3,5029	23,4961	0,00668	4,63
E47	360	3,5029	23,4961	0,00848	5,88
E48	360	3,5029	23,4961	0,00903	6,27
E49	380	3,5070	23,4960	0,00933	6,47
E50	400	3,5070	23,4960	0,01009	7,00
E51	420	3,5070	23,4960	0,01027	7,13
E52	420	3,5070	23,4960	0,01044	7,25

15ª Corrida Experimental - 24/04/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa, RMM 0,149

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
H1	20	3,5054	23,4901	0,00029	0,20
H2	40	3,5054	23,4901	0,00167	1,15
H3	60	3,5054	23,4901	0,00318	2,19
H4	60	3,5054	23,4901	0,00379	2,62
H5	80	3,5057	23,4908	0,00338	2,33

H6	100	3,5057	23,4908	0,00425	2,93
H7	120	3,5057	23,4908	0,00551	3,81
H8	120	3,5057	23,4908	0,00559	3,86
H9	140	3,5055	23,4974	0,00507	3,50
H10	160	3,5055	23,4974	0,00602	4,16
H11	180	3,5055	23,4974	0,00649	4,49
H12	180	3,5055	23,4974	0,00634	4,38
H13	200	3,5079	23,4976	0,00568	3,92
H14	220	3,5079	23,4976	0,00626	4,33
H15	240	3,5079	23,4976	0,00705	4,88
H16	240	3,5079	23,4976	0,00640	4,42
H17	260	3,5053	23,4977	0,00798	5,53
H18	280	3,5053	23,4977	0,00830	5,76
H19	300	3,5053	23,4977	0,00927	6,44
H20	320	3,5005	23,4957	0,00857	5,95
H21	340	3,5005	23,4957	0,00900	6,25
H22	360	3,5005	23,4957	0,00995	6,92
H23	360	3,5005	23,4957	0,01025	7,13
H24	380	3,5056	23,4969	0,00832	5,77
H25	400	3,5056	23,4969	0,00897	6,22
H26	420	3,5056	23,4969	0,01013	7,03
H27	420	3,5056	23,4969	0,01020	7,08

16ª Corrida Experimental - 30/04/2015 - 30°C, HPCE a 400 kPa, RMM 0,149

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
I1	20	3,5013	23,4933	0,00019	0,13
I2	40	3,5013	23,4933	0,00140	0,97
I3	60	3,5013	23,4933	0,00297	2,05
I4	60	3,5013	23,4933	0,00305	2,11
I5	80	3,5001	23,4931	0,00285	1,97
I6	100	3,5001	23,4931	0,00260	1,79
I7	120	3,5001	23,4931	0,00452	3,13
I8	120	3,5001	23,4931	0,00449	3,10
I9	140	3,5022	23,4964	0,00495	3,43
I10	160	3,5022	23,4964	0,00555	3,84
I11	180	3,5022	23,4964	0,00607	4,20
I12	180	3,5022	23,4964	0,00669	4,64
I13	200	3,5023	23,4907	0,00498	3,45
I14	220	3,5023	23,4907	0,00568	3,93
I15	240	3,5023	23,4907	0,00723	5,01
I16	240	3,5023	23,4907	0,00692	4,79
I17	260	3,5097	23,4970	0,00717	4,96
I18	280	3,5097	23,4970	0,00726	5,02
I19	300	3,5097	23,4970	0,00834	5,77

I20	300	3,5097	23,4970	0,00715	4,95
I21	320	3,5031	23,4978	0,00694	4,81
I22	340	3,5031	23,4978	0,00704	4,88
I23	360	3,5031	23,4978	0,00831	5,76
I24	360	3,5031	23,4978	0,00844	5,85
I25	380	3,5025	23,4984	0,00858	5,95
I26	400	3,5025	23,4984	0,00820	5,69
I27	420	3,5025	23,4984	0,00929	6,45
I28	420	3,5025	23,4984	0,00972	6,75

17ª Corrida Experimental - 04/05/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa, RMM 0,202

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
J1	40	4,7566	23,4972	0,00068	0,34
J2	60	4,7566	23,4972	0,00515	2,62
J3	60	4,7566	23,4972	0,00429	2,18
J4	80	4,7574	23,4926	0,00443	2,26
J5	100	4,7574	23,4926	0,00529	2,69
J6	120	4,7574	23,4926	0,00481	2,45
J7	120	4,7574	23,4926	0,00598	3,05
J8	140	4,7523	23,4947	0,00693	3,54
J9	180	4,7523	23,4947	0,00723	3,69
J10	180	4,7523	23,4947	0,00559	2,85
J11	200	4,7537	23,4975	0,01011	5,18
J12	220	4,7537	23,4975	0,01032	5,28
J13	240	4,7537	23,4975	0,00939	4,81
J14	240	4,7537	23,4975	0,00922	4,72
J15	260	4,7583	23,4979	0,00811	4,14
J16	280	4,7583	23,4979	0,01053	5,39
J17	300	4,7583	23,4979	0,00949	4,85
J18	300	4,7583	23,4979	0,00971	4,97
J19	320	4,7504	23,4954	0,00938	4,80
J20	340	4,7504	23,4954	0,01208	6,20
J21	360	4,7504	23,4954	0,01275	6,55
J22	360	4,7504	23,4954	0,01095	5,61
J23	380	4,7531	23,4911	0,01312	6,74
J24	400	4,7531	23,4911	0,01171	6,01
J25	420	4,7531	23,4911	0,01231	6,32
J26	420	4,7531	23,4911	0,01238	6,35

18ª Corrida Experimental - 11/05/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa, RMM 0,255

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
K1	20	6,0013	23,4976	0,00196	0,79
K2	40	6,0013	23,4976	0,00288	1,16
K3	60	6,0013	23,4976	0,00426	1,72
K4	60	6,0013	23,4976	0,00458	1,85
K5	80	6,0018	23,4922	0,00487	1,96
K6	100	6,0018	23,4922	0,00699	2,83
K7	120	6,0018	23,4922	0,00894	3,62
K8	120	6,0018	23,4922	0,00799	3,23
K9	140	6,0045	23,4910	0,00887	3,59
K10	160	6,0045	23,4910	0,00993	4,03
K11	180	6,0045	23,4910	0,01200	4,87
K12	180	6,0045	23,4910	0,01149	4,66
K13	200	6,0008	23,4996	0,01022	4,15
K14	220	6,0008	23,4996	0,01052	4,27
K15	240	6,0008	23,4996	0,01167	4,74
K16	240	6,0008	23,4996	0,01140	4,63
K17	280	6,0050	23,4951	0,01118	4,54
K18	300	6,0050	23,4951	0,01256	5,10
K19	300	6,0050	23,4951	0,01291	5,25
K20	320	6,0040	23,4999	0,01602	6,54
K21	340	6,0040	23,4999	0,01398	5,69
K22	360	6,0040	23,4999	0,01352	5,50
K23	360	6,0040	23,4999	0,01522	6,20
K24	380	6,0081	23,4930	0,01331	5,41
K25	400	6,0081	23,4930	0,01460	5,94
K26	420	6,0081	23,4930	0,01514	6,16
K27	420	6,0081	23,4930	0,01546	6,30

19ª Corrida Experimental - 27/05/2015 - 30°C, Patm, RMM 0,043

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
L1	20	1,0043	23,4926	0,00087	2,09
L2	40	1,0043	23,4926	0,00201	4,84
L3	60	1,0043	23,4926	0,00232	5,59
L4	60	1,0043	23,4926	0,00239	5,74
L5	80	1,0034	23,4992	0,00247	5,95
L6	100	1,0034	23,4992	0,00257	6,20
L7	120	1,0034	23,4992	0,00324	7,82
L8	140	1,0041	23,4919	0,00295	7,11

L9	180	1,0041	23,4919	0,00331	7,96
L10	180	1,0041	23,4919	0,00349	8,42
L11	200	1,0011	23,4977	0,00353	8,54
L12	220	1,0011	23,4977	0,00294	7,11
L13	240	1,0011	23,4977	0,00344	8,30
L14	240	1,0011	23,4977	0,00366	8,86
L15	260	1,0048	23,4995	0,00309	7,44
L16	300	1,0048	23,4995	0,00373	8,97
L17	300	1,0048	23,4995	0,00388	9,35
L18	320	1,0001	23,4950	0,00337	8,15
L19	360	1,0001	23,4950	0,00427	10,32
L20	360	1,0001	23,4950	0,00408	9,87
L21	380	1,0043	23,4996	0,00369	8,88
L22	420	1,0043	23,4996	0,00397	9,56
L23	420	1,0043	23,4996	0,00425	10,24

20ª Corrida Experimental - 29/05/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa, RMM 0,043

Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
M1	20	1,0002	23,4969	0,00172	4,14
M2	40	1,0002	23,4969	0,00234	5,66
M3	80	1,0026	23,4948	0,00277	6,69
M4	120	1,0026	23,4948	0,00321	7,74
M5	120	1,0026	23,4948	0,00344	8,29
M6	140	1,0073	23,4978	0,00398	9,57
M7	160	1,0073	23,4978	0,00394	9,46
M8	180	1,0073	23,4978	0,00349	8,38
M9	180	1,0073	23,4978	0,00307	7,37
M10	200	1,0005	23,4933	0,00379	9,17
M11	220	1,0005	23,4933	0,00368	8,90
M12	240	1,0005	23,4933	0,00361	8,73
M13	240	1,0005	23,4933	0,00397	9,59
M14	260	1,0028	23,4998	0,00383	9,25
M15	280	1,0028	23,4998	0,00393	9,49
M16	300	1,0028	23,4998	0,00342	8,26
M17	300	1,0028	23,4998	0,00360	8,69
M18	360	1,0005	23,4951	0,00389	9,42
M19	360	1,0005	23,4951	0,00429	10,39
M20	380	1,0067	23,4974	0,00394	9,48
M21	400	1,0067	23,4974	0,00437	10,50
M22	420	1,0067	23,4974	0,00466	11,22
M23	420	1,0067	23,4974	0,00477	11,48

21ª Corrida Experimental - 10/06/2015 - 30°C, HPCE a 200 kPa, RMM 0,043					
Amostra	Tempo (minutos)	Massa Microalga (g)	Massa solvente (g)	XI	Rendimento (%)
M24	20	1,0010	23,4941	0,00157	3,78
M25	40	1,0010	23,4941	0,00229	5,53
M26	60	1,0010	23,4941	0,00179	4,31
M27	60	1,0010	23,4941	0,00197	4,75
M28	80	1,0001	23,4962	0,00189	4,55
M29	100	1,0001	23,4962	0,00342	8,27
M30	120	1,0001	23,4962	0,00320	7,74
M31	120	1,0001	23,4962	0,00308	7,45
M32	140	1,0091	23,4989	0,00316	7,58
M33	160	1,0091	23,4989	0,00286	6,84
M34	180	1,0091	23,4989	0,00342	8,19
M35	180	1,0091	23,4989	0,00357	8,56
M36	200	1,0019	23,4953	0,00300	7,24
M37	220	1,0019	23,4953	0,00300	7,23
M38	240	1,0019	23,4953	0,00361	8,72
M39	240	1,0019	23,4953	0,00368	8,87
M40	260	1,0012	23,4903	0,00353	8,53
M41	280	1,0012	23,4903	0,00422	10,2
M42	300	1,0012	23,4903	0,00398	9,62
M43	300	1,0012	23,4903	0,00384	9,27
M44	320	1,0057	23,4988	0,00428	10,29
M45	340	1,0057	23,4988	0,00385	9,27
M46	360	1,0057	23,4988	0,00432	10,39
M47	360	1,0057	23,4988	0,00436	10,50
M48	400	1,0006	23,4944	0,00395	9,56
M49	420	1,0006	23,4944	0,00410	9,93
M50	420	1,0006	23,4944	0,00411	9,94

**ANEXO III – Valores da taxa de extração k_1 obtidos por regressão não linear
para diferentes condições de extração**

Taxas de extração (k_1) obtidas por regressão não linear nas diferentes condições experimentais

Condição	Nº pontos experimentais	k_1	U_{k_1}
P atm; RMM 0,043	48	0,0139	0,0025
P atm; RMM 0,096	65	0,0049	0,0008
P atm; RMM 0,149	56	0,0065	0,0010
P atm; RMM 0,202	29	0,0037	0,0009
P atm; RMM 0,255	26	0,0077	0,0017
HPCE 200 kPa; RMM 0,043	54	0,0132	0,0022
HPCE 200 kPa; RMM 0,096	82	0,0035	0,0008
HPCE 200 kPa; RMM 0,149	29	0,0044	0,0010
HPCE 200 kPa; RMM 0,202	29	0,0034	0,0014
HPCE 200 kPa; RMM 0,255	29	0,0055	0,0010
HPCE 400 kPa; RMM 0,096	57	0,0043	0,0007
HPCE 600 kPa; RMM 0,096	28	0,0033	0,0010