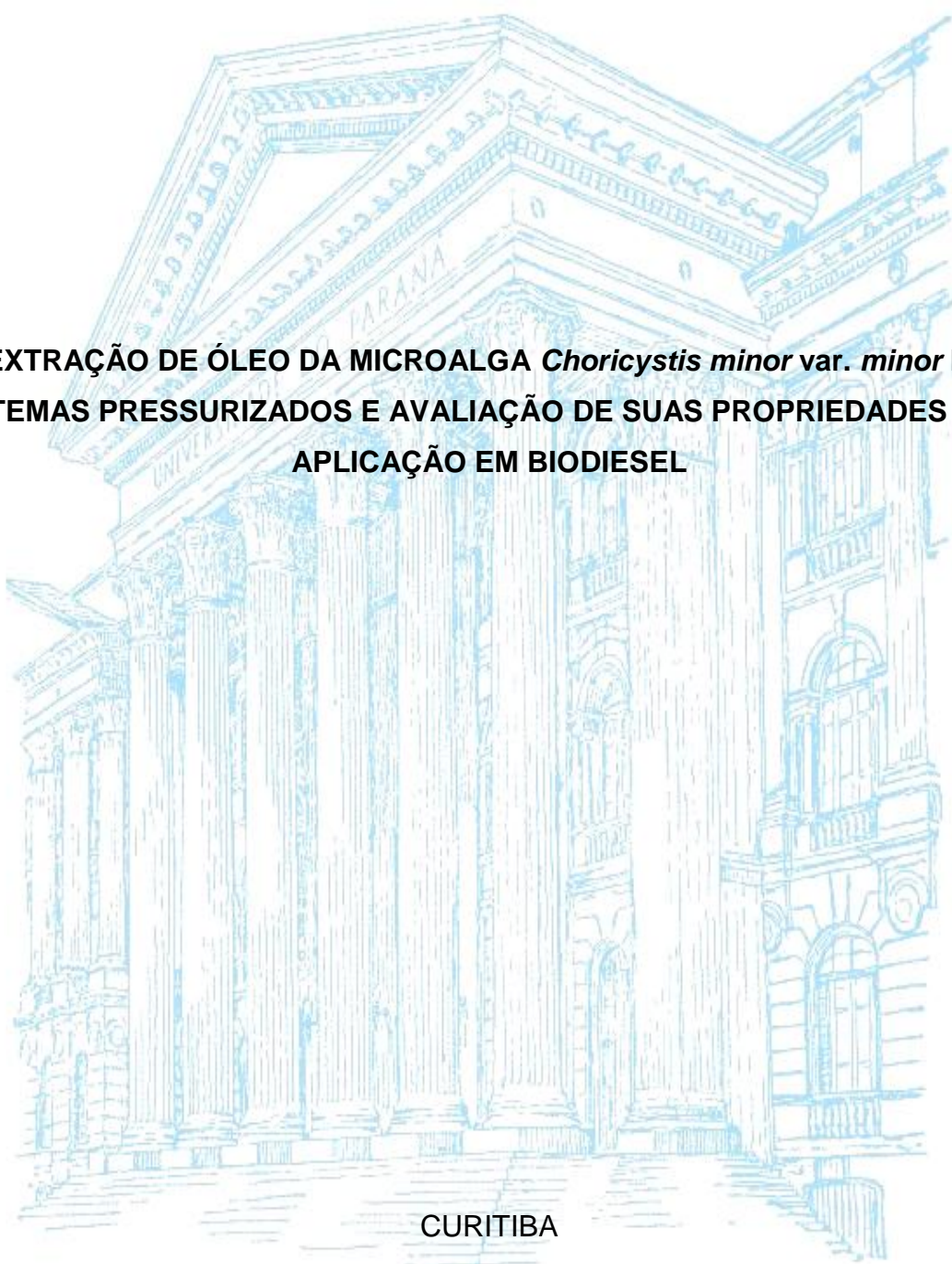


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE ANDREZA DA CRUZ LIMA



**EXTRAÇÃO DE ÓLEO DA MICROALGA *Choricystis minor* var. *minor* EM  
SISTEMAS PRESSURIZADOS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES PARA  
APLICAÇÃO EM BIODIESEL**

CURITIBA

2017

ALINE ANDREZA DA CRUZ LIMA

**EXTRAÇÃO DE ÓLEO DA MICROALGA *Choricystis minor* var. *minor* EM  
SISTEMAS PRESSURIZADOS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES PARA  
APLICAÇÃO EM BIODIESEL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, no Curso de Ciências Exatas do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA

2017

---

L732e

Lima, Aline Andreza da Cruz

Extração de óleo da microalga *Choricystis minor* var. *minor* em sistemas pressurizados e avaliação de suas propriedades para aplicação em biodiesel / Aline Andreza da Cruz Lima. – Curitiba, 2017.

100 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Luiz Pereira Ramos – Co-orientador: Marcos Lúcio Corazza,.

Bibliografia: p. 87-96.

1. Microalga. 2. Extração com fluido supercrítico. 3. Alga – Aspectos econômicos. 4. Biodiesel. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Corazza, Marcos Lúcio. IV. Título.

CDD: 582.26

---

TERMO DE APROVAÇÃO

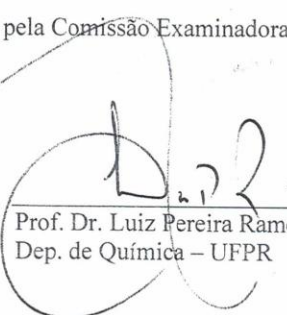
**EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGA CHORÍCYSTIS MINOR VAR.  
MINOR EM SISTEMAS PRESSURIZADOS E DETERMINAÇÃO DE SUAS  
PROPRIEDADES PARA APLICAÇÃO EM BIODIESEL**

por


**ALINE ANDREZA DA CRUZ LIMA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:


Orientador:



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos  
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho  
Instituto de Química – UFG



Prof. Dr. Francisco de Assis Marques  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de junho de 2017.

Dedico este trabalho a meus pais Carlos e Cleide, minha irmã Caroline e meu tio Valdir que me apoiaram durante esta etapa.

## AGRADECIMENTOS

A meus familiares e amigos pelo apoio, paciência e compreensão por todos os momentos de ausência durante este período.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos pelos ensinamentos e orientação para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza pela co-orientação, por todas as sugestões e ensinamentos.

Ao professor Roberto Bianchini Derner do Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por ter fornecido a matéria-prima objeto de estudo desta pesquisa.

Aos membros da banca de qualificação Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Beatriz H. L. de N. Sales Maia e Prof. Dr. Francisco de Assis Marques pelas contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao técnico Marcelo Zadorecki do Laboratório de Química Analítica e Alimentos do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) pela realização da análise de proteínas.

À Pós-doutoranda Daiane Szczerbowski Montes Vidal e ao Professor Dr. Arion Zandoná Filho pelo suporte na análise dos extratos.

Aos colegas do Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA) Luiz Kanda, Alexis Escorsim, Amanda Guedes, Ariadine Reder, Damian Fetzer, João Folador e Luciana Madeira pelas discussões científicas e cooperação durante os experimentos realizados no LACTA.

Aos colegas de trabalho do Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ) Vinícius Kothe, Débora Kochepka, Laís Dill, Gustavo Gomes pela ajuda nas atividades que precisei desenvolver neste laboratório.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) Marcelino Câmara e à Assistente Fernanda Gabardo por todo auxílio durante esse período, assim como, à coordenação e a todos os professores que contribuíram para minha formação durante este curso.

Aos órgãos financiadores CNPq, FINEP e à Universidade Federal do Paraná.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento desta dissertação.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

(Paulo Freire)

## RESUMO

O uso das microalgas como fonte de material graxo tem sido apresentado como uma alternativa promissora para produção de biodiesel, devido à elevada produção lipídica destes organismos e pelo fato de não serem necessárias grandes áreas territoriais para seu cultivo. Entretanto, um dos aspectos que precisam ser estudados para viabilizar a produção de biocombustíveis de microalga é a extração seletiva do óleo, além da escolha de uma espécie capaz de produzir material lipídico com perfil químico adequado para produção de biodiesel. Neste trabalho, a conversão em monoésteres metílicos de extratos obtidos da microalga *Choricystis minor* var. *minor* foi avaliada por extração convencional com diferentes solventes (hexano, etanol e clorofórmio :metanol) e por extração com fluidos pressurizados (CO<sub>2</sub> e propano) associados ou não ao uso dos cossolventes (etanol e hexano). Na extração convencional o etanol se mostrou mais eficiente do que os demais solventes, propiciando um rendimento mássico de 30,5% do extrato, enquanto que o hexano apresentou rendimento de apenas 10,6%. Todavia, o potencial de conversão em ésteres foi maior para a extração com hexano (84,1 g de éster por 100 g de extrato) do que para os extratos etílicos (33,5 g de éster por 100g de extrato). Nesse sentido, o teor de ésteres totais em relação à massa da microalga utilizada não apresentou diferenças significativas entre os três solventes testados. O emprego de sistemas pressurizados, na ausência e na presença de cossolventes, gerou maiores rendimentos de extração. O etanol apresentou o melhor desempenho como cossolvente na proporção 1:1 em relação à massa de microalga, independentemente do solvente primário utilizado no sistema de extração (CO<sub>2</sub> e propano). O maior rendimento obtido com propano pressurizado na presença de etanol atingiu 27,54% em relação a massa da microalga seca nas condições de 80 °C e 50 bar, enquanto que, para o CO<sub>2</sub> na presença do mesmo cossolvente, o rendimento alcançado foi de 31,57% a 80 °C e 150 bar. Esses rendimentos estão próximos aos obtidos pela extração convencional em sistema Soxhlet, porém, com a vantagem de que nos dois casos, com propano ou CO<sub>2</sub>, o tempo necessário para se atingir o rendimento máximo foi igual ou inferior a 20 min. O teor de ésteres totais em relação à massa de microalga foi superior nas extrações de maior rendimento com etanol e CO<sub>2</sub> (16,7 g/100g de biomassa), se comparado às demais condições experimentais envolvidas nesse estudo. Os perfis de ácidos graxos dos extratos obtidos nesse estudo foram semelhantes entre si e sua composição, liderada pelos ácidos palmítico (16%), oleico (35%) e linoleico (10%), sugere propriedades adequadas para a produção de biocombustíveis líquidos (biodiesel).

**Palavras-chave:** *Choricystis minor* var. *minor*. Extração. Fluido pressurizado. Biodiesel.

## ABSTRACT

The use of microalgae as a source of fatty materials has been presented as a promising alternative for biodiesel production due to the high lipid productivity of these organisms and the fact that large territorial areas are not necessary for their cultivation. However, one of the aspects that need to be studied in order to make feasible the production of microalgae biofuels is the selective extraction of the oil, besides the choice of a species capable of producing lipid material with a suitable chemical profile for biodiesel production. In this work, fatty acid methyl esters were produced from the microalga *Choricystis minor* var. *minor*, whose lipophilic materials were extracted with conventional (hexane, ethanol and chloroform: methanol) and pressurized solvents (CO<sub>2</sub> and compressed propane), associated or not with the use of co-solvents (ethanol and hexane). Ethanol was the most efficient solvent for the conventional extraction in Soxhlet, providing a mass yield of 30.5% of the extract, while the hexane presented a yield of only 10.6%. However, the conversion potential to fatty acid methyl esters was higher for hexane extracts (84.1 g ester per 100 g extract) compared to ethanol (33.5 g ester per 100 g extract). In this sense, the total esters content in relation to the mass of the microalga used did not present any significant difference among the three solvents tested. The use of pressurized systems, in the absence and presence of co-solvents, generated higher extraction yields. Ethanol had the best co-solvent performance when used in the ratio of 1:1 in relation to the microalga dry mass, regardless of the primary solvent used in the extraction system (CO<sub>2</sub> and compressed propane). The highest process yield was obtained with compressed propane in the presence of ethanol, which reached 27.54% of the mass of the dry microalga under the conditions of 80 °C and 50 bar, whereas for CO<sub>2</sub> in the presence of the same co-solvent the yield reached was 31.57% at 80 °C and 150 bar. These yields are close to those obtained by conventional extraction in a Soxhlet apparatus, however, with the advantage that in both cases, with propane or CO<sub>2</sub>, the time required to reach the maximum yield was equal to or less than 20 min. The total esters content in relation to the microalgae mass was higher in for extractions of higher yield using ethanol and CO<sub>2</sub> (16.7 g/100 g biomass), when compared to the other experimental conditions involved in this study. The fatty acid profile of the extracts obtained in this study was similar to each other, being composed mainly by palmitic, oleic and linoleic acids in the relative proportion of 16%, 35% and 10%, respectively. In principle, this composition is compatible with their application as raw material for the production of liquid biofuels such as biodiesel.

**Key-words:** *Choricystis minor* var. *minor*. Extraction. Pressurized fluids. Biodiesel.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO...	20
FIGURA 2	ESQUEMA PARA MECANISMO DE TRANSESTERIFICAÇÃO BÁSICA DE TRIACILGLICEROIS.....	21
FIGURA 3	ESQUEMA PARA REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA DE TRIACILGLICEROIS.....	22
FIGURA 4	ESQUEMA PARA O MECANISMO DE ESTERIFICAÇÃO ÁCIDA	23
FIGURA 5	ETAPAS DO PROCESSO DE HIDROESTERIFICAÇÃO.....	24
FIGURA 6	ROTA PARA SÍNTESE DE ÁCIDO GRAXO APÓS REAÇÃO SE SAPONIFICAÇÃO.....	25
FIGURA 7	PRINCIPAIS FONTES DE TRIACILGLICEROIS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL.....	26
FIGURA 8	REPRESENTAÇÃO DO APARATO SOXHLET.....	32
FIGURA 9	ESQUEMA PARA DESCRIÇÃO DA EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	37
FIGURA 10	CURVA DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO PRESSURIZADO.....	38
FIGURA 11	ESQUEMA DE APARATO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÕES COM FLUIDO PRESSURIZADO.....	50
FIGURA 12	ASPECTO DA MICROALGA <i>Choricystis minor</i> var. <i>minor</i> .....	54
FIGURA 13	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA <i>Choricystis minor</i> var. <i>minor</i> SECA EM ESTUFA ANALISADO POR CROMATOGRAFIA A GÁS NA FORMA DE ÉSTERES METÍLICOS	57
FIGURA 14	CURVAS REPRESENTANDO A CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>Choricystis minor</i> var. <i>minor</i> UTILIZANDO CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO.....	66
FIGURA 15	DIAGRAMA DE PARETO DAS VARIÁVEIS PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO ASSOCIADO AO ETANOL COMO COSSOLVENTE.....	69
FIGURA 16	CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO VARIANDO CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO E ETANOL.....	70

FIGURA 17	CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO VARIANDO CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO SEM ETANOL.....	73
FIGURA 18	DIAGRAMA DE PARETO DAS VARIÁVEIS PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM PROPANO E ETANOL.....	75
FIGURA 19	CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO VARIANDO CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO COM ETANOL.....	76
FIGURA 20	CURVAS PARA AS EXTRAÇÕES NAS MELHORES CONDIÇÕES COM PROPANO PRESSURIZADO (80 °C E 100 BAR) E SC-CO <sub>2</sub> (80 °C E 250 BAR).....	77
FIGURA 21	CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO PARA OS PONTOS CENTRAIS DOS PLANEJAMENTOS COM PROPANO E SC-CO <sub>2</sub> ACOMPANHADO DOS COSSOLVENTES HEXANO E ETANOL.....	77
FIGURA 22	RESÍDUOS DAS EXTRAÇÕES A 80°C E 150 BAR NA PRESENÇA (A) E AUSÊNCIA DE ETANOL (B).....	81
FIGURA 23	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS OBTIDOS EM FLUIDO PRESSURIZADO, ANALISADOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS NA FORMA DE ÉSTERES METÍLICOS	86

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PRODUTIVIDADE DE ÓLEO DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS PARA BIODIESEL.....	27
TABELA 2	CONTEÚDO LIPÍDICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS.....	29
TABELA 3	ESTUDOS SOBRE O USO DE DIFERENTES SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGAS.....	33
TABELA 4	CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO CRÍTICAS PARA DIFERENTES SOLVENTES.....	36
TABELA 5	ESTUDOS SOBRE O USO DE CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO DE MATERIAL LIPÍDICO DE MICROALGAS.....	39
TABELA 6	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>2</sup> PARA EXTRAÇÕES COM CO <sub>2</sub> EM ESTADO SUPERCRÍTICO COM E SEM ADIÇÃO DE ETANOL COMO COSSOLVENTE.....	51
TABELA 7	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>2</sup> PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO PRESSURIZADO COM E SEM ADIÇÃO DE ETANOL COMO COSSOLVENTE.....	52
TABELA 8	ANÁLISE DE UMIDADE DA MATÉRIA- PRIMA.....	53
TABELA 9	DETERMINAÇÃO DE CINZAS E PROTEÍNAS DA MICROALGA <i>Choricystis minor var. minor</i> .....	54
TABELA 10	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA <i>Choricystis minor var. minor</i> , CARACTERIZADOS POR CROMATOGRAFIA NA FORMA MONOÉSTERES METÍLICOS.....	58
TABELA 11	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>Choricystis minor var. minor</i> EM SISTEMA CONVENCIONAL COM DIFERENTES SOLVENTES.....	60
TABELA 12	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS <i>Choricystis minor var minor</i> OBTIDOS EM SISTEMA SOXHLET.....	63
TABELA 13	RENDIMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA AS EXTRAÇÕES COM SC-CO <sub>2</sub> .....	64

TABELA 14 PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM SC-CO <sub>2</sub> .....	67
TABELA 15 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO SC-CO <sub>2</sub> COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE.....	68
TABELA 16 PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM SC-CO <sub>2</sub> E ETANOL.....	68
TABELA 17 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO PROPANO SEM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE.....	71
TABELA 18 PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AOS DADOS DE RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM PROPANO PRESSURIZADO..	72
TABELA 19 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO E ETANOL.....	74
TABELA 20 PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM PROPANO E ETANOL.....	74
TABELA 21 RENDIMENTO GLOBAL DAS EXTRAÇÕES COM SOLVENTES PRESSURIZADOS.....	78
TABELA 22 RENDIMENTO EM ÉSTERES PARA OS PROCESSOS EXTRATIVOS COM GASES PRESSURIZADOS ASSOCIADOS OU NÃO A COSSOLVENTES.....	80
TABELA 23 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PARA OS EXTRATOS OBTIDOS COM SC-CO <sub>2</sub> .....	83
TABELA 24 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PARA OS EXTRATOS OBTIDOS COM PROPANO PRESSURIZADO.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANOVA – Análise de Variância

BBM – meio básico de cultivo Bold, do inglês *Bold's Basal Medium*

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CER – Taxa de extração constante, do inglês *Constant Extraction Rate*”

DAG – Diacilglicerol

DC – Etapa controlada pela difusão, do inglês *Diffusion Controlled*

FAME – Ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*

FER – Taxa de extração decrescente, do inglês *Falling Extraction Rate*”

GC – Cromatografia de fase gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

MAG - Monoacilglicerol

MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

p.p. – pontos percentuais

sc-CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono em estado supercrítico

OVEG - Programa de Óleos Vegetais

WC –meio de cultivo para criptófitas de Wright, do inglês *Wright's Cryptophyte*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 ROTAS QUÍMICAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	20
2.1.1 Transesterificação .....	20
2.1.2 Esterificação .....	22
2.1.3. Hidroesterificação .....	23
2.1.4. Saponificação seguida de esterificação .....	24
2.2 FONTES DE TRIACILGLICEROIS PARA APLICAÇÃO EM BIODIESEL .....	25
2.3 MICROALGAS .....	28
2.4 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO .....	31
2.5 EXTRAÇÃO COM FLUIDO PRESSURIZADO .....	35
2.5.1 Extração com fluido pressurizado de óleo de microalgas .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 MATERIAIS .....	43
4.2 MÉTODOS .....	43
4.2.1 Preparo de amostra .....	43
4.2.2 Secagem .....	44
4.2.3 Determinação de umidade .....	44
4.2.4 Análise de cinzas ou resíduos por incineração .....	44
4.2.5 Determinação de teor de proteínas .....	45
4.2.6 Granulometria e preparo da amostra .....	45
4.2.7 Esterificação do material lipídico da microalga .....	46
4.2.8 Análise cromatográfica para determinação do perfil de ésteres .....	47
4.2.9 Extração de óleo de microalga em sistema convencional .....	48
4.2.10 Densidade real e aparente das partículas da amostra .....	49
4.2.11 Porosidade do leito de extração .....	49

4.2.12 Extração de óleo de microalga em sistema com fluido pressurizado. ....	50
4.2.13 Avaliação dos resultados.....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA .....	53
5.1.1. Determinação de umidade. ....	53
5.1.2. Análise de cinzas e proteína.....	53
5.1.3. Granulometria. ....	55
5.1.4. Densidade real, aparente e porosidade.....	56
5.2. TEOR DE ÉSTERES E PERFIL CROMATOGRÁFICO DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA .....	57
5.3. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL .....	60
5.4. CINÉTICA E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO (sc-CO <sub>2</sub> ) .....	64
5.4.1. Rendimento e cinética de extração utilizando apenas sc-CO <sub>2</sub> .....	64
5.4.2. Rendimento e cinética de extração utilizando sc-CO <sub>2</sub> na presença de etanol. ....	67
5.5. CINÉTICA E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO PROPANO PRESSURIZADO.....	71
5.5.1. Rendimento e cinética de extração utilizando apenas propano. ....	71
5.5.2. Rendimento e cinética de extração utilizando propano associado ao etanol. ....	73
5.6. COMPARAÇÃO ENTRE AS EXTRAÇÕES COM PROPANO E CO <sub>2</sub> PRESSURIZADO .....	76
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE1 .....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, preocupações com problemas ambientais, além de questões econômicas relacionadas à dependência do uso de combustíveis derivados de fontes não renováveis, têm despertado interesse em estudos sobre o desenvolvimento de tecnologias de produção e uso de biocombustíveis líquidos. Nesse contexto, o biodiesel tem destaque por se tratar de um possível substituto ao diesel derivado do petróleo. O diesel é composto de uma mistura complexa de hidrocarbonetos parafínicos, aromáticos e naftênicos cujo uso em larga escala apresenta um alto impacto ambiental (LANJEKAR *et al.*, 2016). Esse combustível é utilizado em veículos que transportam bens de consumo, incluindo produtos agrícolas e industriais. Portanto, substituí-lo total ou parcialmente exige a seleção de um produto compatível, pois qualquer alteração na sua disponibilidade ou custo de produção pode gerar grande impacto na economia (MEHER *et al.*, 2006; MAHMUDUL *et al.*, 2017; SUAREZ *et al.*, 2007).

O biodiesel é definido na Resolução Nº 45 de 25/08/2014 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) como um combustível composto por monoésteres alquílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzidos a partir da transesterificação e/ou esterificação de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, ainda complementa a definição considerando o biodiesel como um combustível derivado de fonte renovável, utilizado como substituto parcial ou total do diesel de petróleo.

A produção e consumo de biodiesel no Brasil foi incentivada através de programas governamentais como o OVEG de 1983 e o PROBIODIESEL de 2002. No entanto, essas iniciativas foram substituídas em 2003 pelo Programa Nacional de Produção de Biodiesel (PNPB) (RAMOS *et al.*, 2011). Desde o seu início, o PNPB foi norteado por diretrizes que visam proporcionar condições para produção de biodiesel a partir de diferentes matrizes oriundas das mais diversas regiões do país, tornando o preço deste produto competitivo e promovendo a inclusão social de pequenos produtores rurais (OSAKI *et al.*, 2011; TAPANES *et al.*, 2013). Em paralelo ao PNPB foram decretadas leis que determinam a obrigatoriedade da adição do biodiesel ao diesel de maneira gradual. O primeiro decreto de 2008 tornou obrigatória a adição de biodiesel ao diesel na proporção de 2% (B2); posteriormente, em 2005, a obrigatoriedade passou a ser de 5% (B5) e, recentemente, a Lei

13.263/2016 definiu um aumento na proporção de biodiesel em relação ao diesel para 8% a partir de 1º de março de 2017 (ANP, 2017; CASA CIVIL, 2017; RAMOS *et al.*, 2011; TAPANES *et al.*, 2013). Este acréscimo de biodiesel ao diesel é possível pela compatibilidade da frota atual de veículos à utilização de misturas de biodiesel e diesel sem a necessidade de grandes alterações no motor. Naturalmente, isso não ocorre com outros tipos de biocombustíveis veiculares como o hidrogênio ou o gás natural, sendo esta uma das grandes vantagens do biodiesel (KNOTHE, 2006).

Outros aspectos positivos ainda podem ser associados ao uso do biodiesel, tais como menor emissão de poluentes, maior biodegradabilidade, maior lubrificidade, alto ponto de fulgor, melhores propriedades combustíveis e baixa toxidez. Em consequência, os produtos da combustão do biodiesel geram 50% menos material particulado se comparado ao diesel de petróleo (MAHMUDUL *et al.*, 2017; TAPANES *et al.*, 2013). Entre os aspectos negativos associados ao uso de biodiesel estão o seu menor poder calorífico, sua menor estabilidade à oxidação e ao armazenamento, sua alta susceptibilidade à contaminação microbiana, sua eventual incompatibilidade com materiais poliméricos presentes em partes internas do motor e seu elevado custo de produção em relação ao diesel de petróleo (SILVA *et al.*, 2008).

A escolha da matéria-prima para síntese do biodiesel pode influenciar na rota empregada para a sua produção devido às características químicas como acidez, teor de água e presença de contaminantes (FUKUDA *et al.*, 2001). A seleção da fonte de triacilgliceróis também é relevante no que tange ao custo, pois pode gerar um impacto de até 75% no valor do produto final (AHMAD *et al.*, 2011). Outro aspecto a ser considerado é o processo de extração em relação a sua eficiência e capacidade de produção de um material graxo adequado para o processo de produção de biodiesel.

Entre as diferentes fontes de triacilgliceróis que podem ser empregadas para produção de biodiesel encontram-se as microalgas. Algumas espécies desses organismos apresentam elevados teores de material lipídico e podem ser produzidas em sistemas de cultivo que ocupam menores áreas que o cultivo extensivo de plantas oleaginosas como soja, canola e palma de óleo (MATA *et al.*, 2010). Dentre as espécies até hoje estudadas e aceitas como adequadas para a síntese de biodiesel está a microalga dulcícola *Choricystis minor var. minor*. Esta microalga,

segundo os estudos de Menezes *et al.* (2016), apresenta produtividade em biodiesel da ordem de  $11 \text{ t ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ , que é bastante superior ao estimado para soja, canola e outras oleaginosas (MATA *et al.*, 2010). Além disso, o perfil lipídico desse microrganismo tem sido considerado satisfatório para atender tanto às exigências dos processos convencionais de produção de biodiesel quanto às normas que regem o seu uso como substituto parcial ou total do diesel de petróleo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

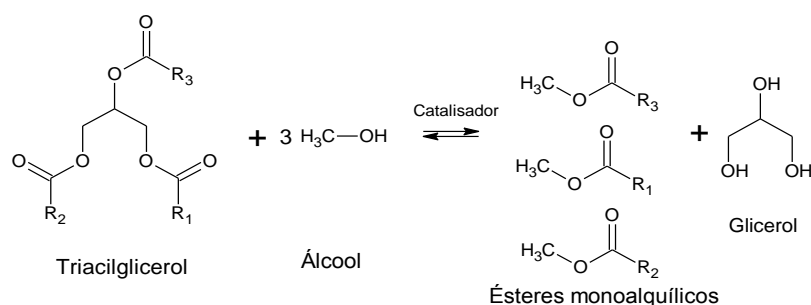
### 2.1 ROTAS QUÍMICAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.

O biodiesel pode ser produzido por diferentes rotas químicas, dependendo das propriedades e composição da matéria-prima (RAMOS *et al.*, 2011) e estas podem envolver reações de transesterificação (FUKUDA *et al.*, 2001; SUGANYA *et al.*, 2016), esterificação (FUKUDA *et al.*, 2001; SUGANYA *et al.*, 2016), hidroesterificação (ARANDA *et al.*, 2009; MELLO *et al.*, 2017; POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016) e saponificação seguida de esterificação (HARTMAN *et al.*, 1973; MENEZES *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Transesterificação.

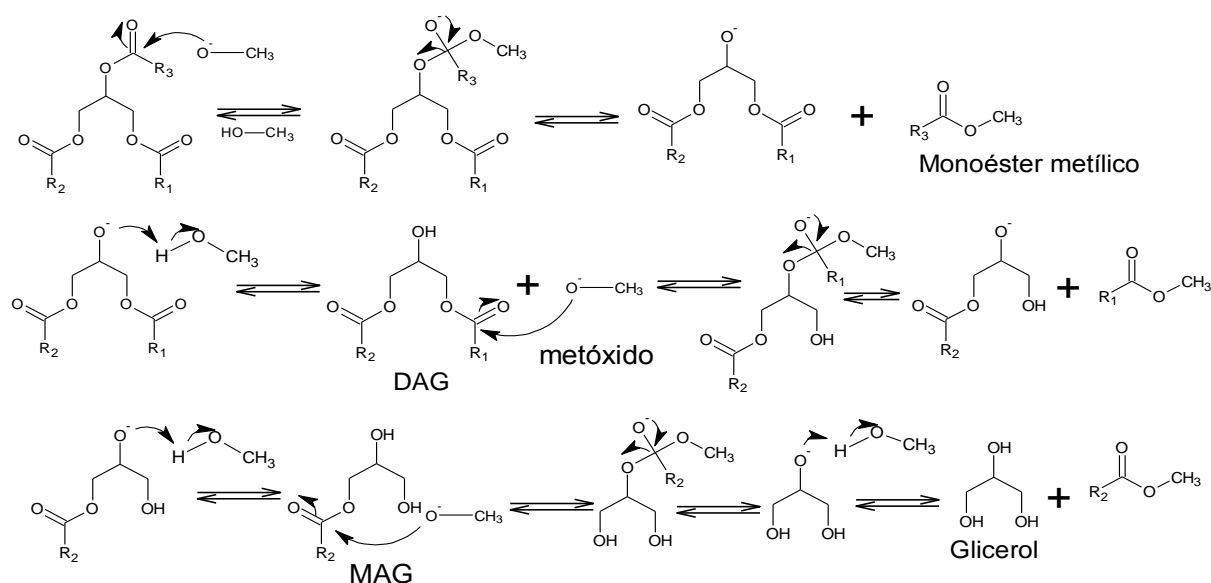
A transesterificação é uma reação de substituição nucleofílica que ocorre entre uma molécula de triacilglicerol e três moléculas de um álcool em três etapas consecutivas e reversíveis, com formação de monoésteres alquílicos em cada uma das etapas, além de intermediários de reação como diacilglicerois (DAG) e monoacilglicerois (MAG) e glicerol como coproduto. Para aumentar a velocidade dessas reações são geralmente utilizados catalisadores básicos (hidróxidos de sódio e de potássio), ácidos (ácido sulfúrico) ou enzimáticos (lipases livres e imobilizadas) (CLAYDEN, 2012; MEHER *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2011; SUAREZ *et al.*, 2007). Embora a relação estequiométrica da transesterificação envolva um mol de triacilglicerol e três mols de álcool (FIGURA 1), recomenda-se que esse último esteja em excesso para garantir maiores rendimentos de síntese mediante o deslocamento do equilíbrio químico no sentido da formação de produtos (RAMOS *et al.*, 2011; SUAREZ *et al.*, 2007).

FIGURA 1 - EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.



Entre as catálises citadas acima a mais utilizada é a básica cujas etapas estão representadas no esquema da FIGURA 2, correspondente à metanólise de um triacilglicerol catalisada pela utilização do ânion metóxido (MEHER *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2011; SUAREZ *et al.*, 2007). Nessa rota catalítica o ânion metóxido atua como nucleófilo sobre o carbono da carbonila do triacilglicerol, levando à formação de um intermediário tetraédrico, seguida da produção de uma molécula de diacilglicerol (DAG) e reconstituição do catalisador, além da formação de uma molécula de monoéster alquílico. Em etapa posterior o DAG sofre novo ataque nucleofílico por parte do metóxido seguindo rota semelhante à do triacilglicerol, formando uma molécula de monoacilglicerol (MAG) e uma nova molécula de monoéster alquílico. Finalmente, na última etapa tem-se a produção do glicerol e uma terceira molécula de monoéster metílico, conforme apresentado na FIGURA 2 (RAMOS *et al.*, 2011; SCHUCHARDT *et al.*, 1998; SUGANYA *et al.*, 2016).

FIGURA 2- ESQUEMA PARA MECANISMO DE TRANSESTERIFICAÇÃO BÁSICA DE TRIACILGLICEROIS



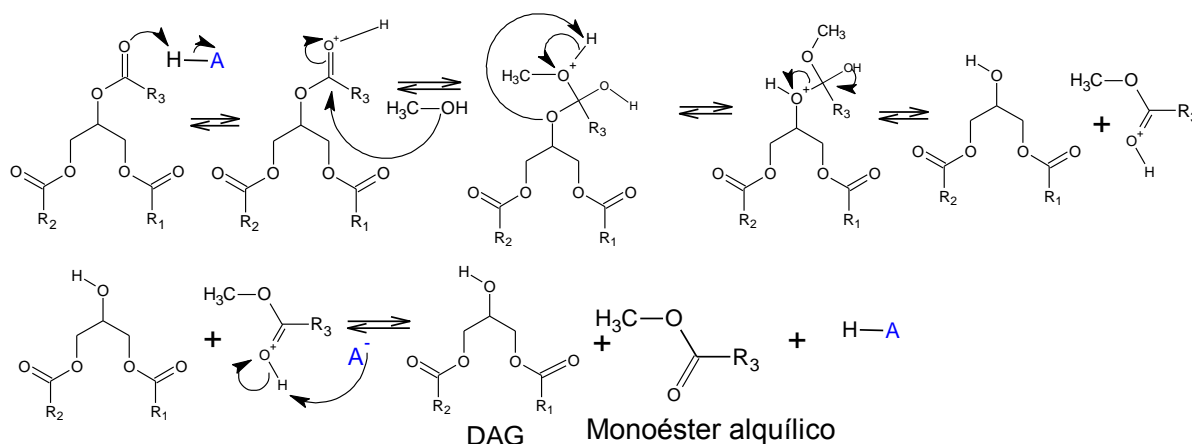
FONTE: adaptado de SUGANYA *et al.* (2016)

A transesterificação alcalina é recomendada para matrizes com baixo teor de ácidos graxos livres (abaixo de 3%) (MEHER *et al.*, 2006) e água, pois a presença desses dois componentes leva à formação de sabões que consomem o catalisador e facilitam a formação de emulsões, causando perdas expressivas de rendimento por dificultar a separação entre os ésteres e o glicerol (FUKUDA *et al.*, 2001; MEHER *et*

*al.*, 2006). Com o intuito de utilizar matérias-primas de alta acidez é possível optar pelo uso de catálise ácida, porém, o processo de transesterificação pode se tornar até 4.000 vezes mais lento do que a catálise básica (FUKUDA *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2011).

As etapas que demonstram a produção de monoésteres metílicos via transesterificação em meio ácido estão demonstradas na FIGURA 3. Em um primeiro momento o éster recebe um próton do catalisador ácido tornando o carbono da carbonila mais suscetível ao ataque nucleofílico do álcool que no exemplo da FIGURA 3 corresponde ao metanol. Posteriormente ocorre a eliminação de uma molécula de DAG e a produção de uma molécula de monoéster metílico. A molécula de DAG reage novamente com o catalisador pelo mesmo mecanismo, formando mais uma molécula de monoéster metílico e MAG, até que na última etapa são produzidos o glicerol e a terceira molécula de monoéster metílico do processo de conversão (MEHER *et al.*, 2006; SUGANYA *et al.*, 2016).

FIGURA 3- ESQUEMA PARA REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA DE TRIACILGLICEROIS



FONTE: adaptado de RAMOS *et al.* (2011); CLAYDEN (2012)

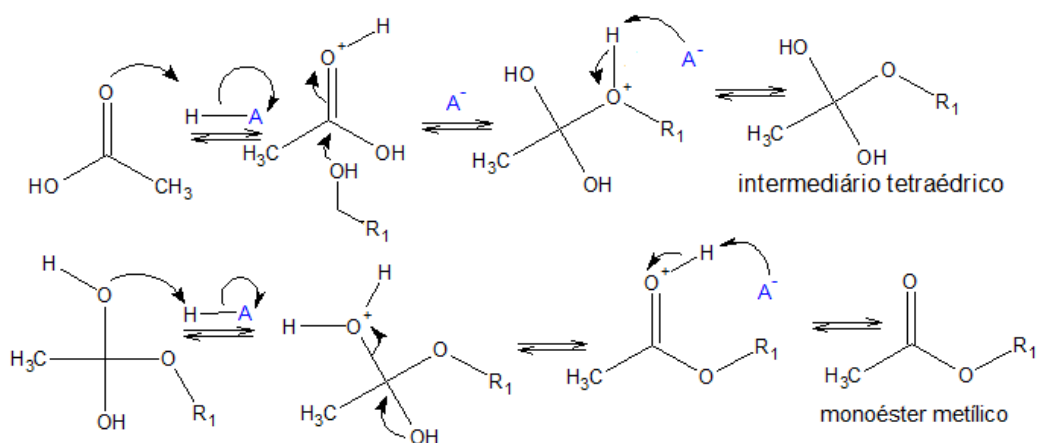
### 2.1.2 Esterificação

O processo que emprega a reação de esterificação merece destaque na produção de biodiesel quando se considera a possibilidade de uso de matérias-primas de elevada acidez e com menor valor agregado, como resíduos de processo de refino de óleos vegetais (borrás ácidas), gorduras de descarte ou óleo residual de

fritura que sejam constituídas de elevada quantidade de ácidos graxos livres (BASKAR *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2011).

A FIGURA 4 apresenta o mecanismo da reação de esterificação. Inicialmente, a carbonila é protonada pelo catalisador ácido, permitindo o ataque nucleofílico do álcool e a posterior formação de um intermediário tetraédrico. Este intermediário é então protonado e, após a eliminação de uma molécula de água, o catalisador é reconstituído e uma molécula de monoéster alquílico é liberada no meio de reação (CLAYDEN, 2012).

FIGURA 4 - ESQUEMA PARA O MECANISMO DE ESTERIFICAÇÃO ÁCIDA



FONTE: adaptado de CLAYDEN (2012)

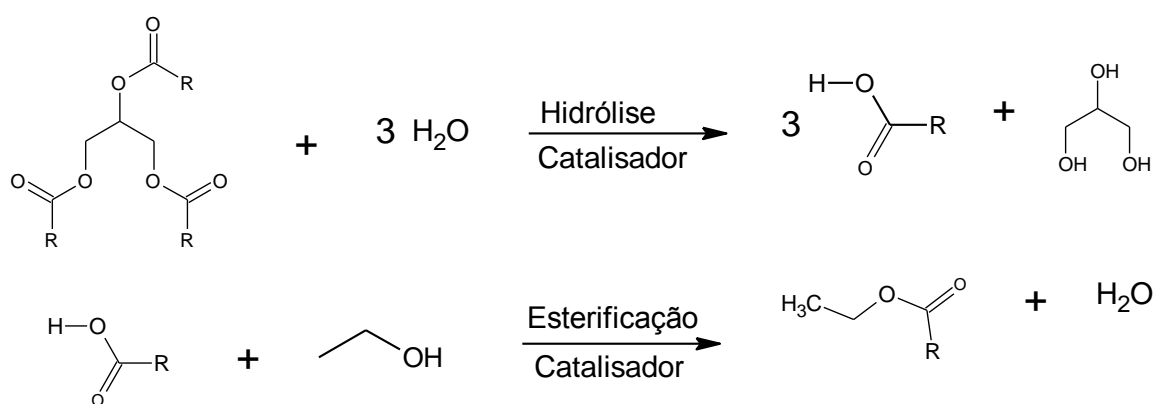
Nas reações de esterificação, o processo inverso, ou seja, a hidrólise do éster formado também pode ser catalisada pelo ácido inorgânico. Por esta razão a presença de elevados teores de água pode provocar o deslocamento do equilíbrio químico no sentido da formação dos reagentes. Com o intuito de evitar essa reversibilidade utilizam-se estratégias como a remoção de água do meio reacional ou o emprego de excesso de álcool (CLAYDEN, 2012).

### 2.1.3. Hidroesterificação

Estudos recentes têm apresentado alternativas para a produção de biodiesel a partir de material com elevada acidez e umidade que não seriam adequadas para processos de transesterificação ou esterificação, respectivamente. Este processo é denominado hidroesterificação e consiste basicamente na hidrólise dos

triacilgliceróis levando à formação de ácidos graxos e glicerol, seguida da remoção do glicerol e água existente no meio reacional para posterior esterificação dos ácidos graxos livres. Estas etapas estão equacionadas na FIGURA 5. A possibilidade de utilização de uma maior variedade de matérias-primas, incluindo rejeitos e materiais de descarte, é uma das vantagens da hidroesterificação, o que pode permitir uma redução nos custos de produção do biodiesel (ARANDA *et al.*, 2009; ENCARNAÇÃO, 2008; RAMOS *et al.*, 2011; SILVEIRA, 2014).

FIGURA 5 - ETAPAS DO PROCESSO DE HIDROESTERIFICAÇÃO

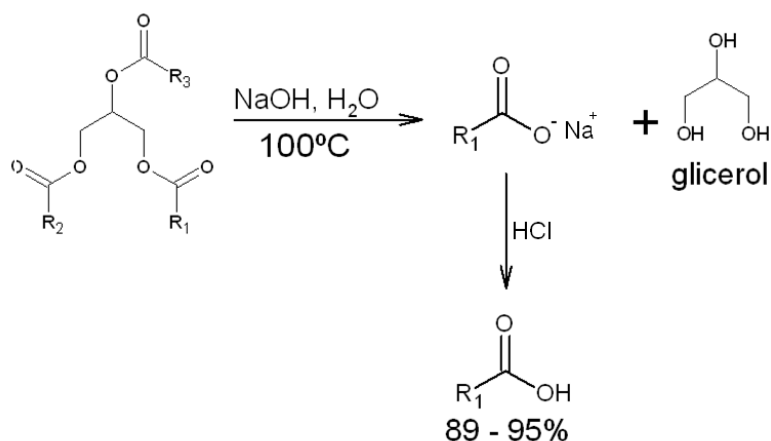


FONTE: RAMOS *et al.* (2011)

#### 2.1.4. Saponificação seguida de esterificação

A saponificação é definida como a hidrólise alcalina de ésteres que gera ao final do processo sais de ácidos carboxílicos (sabões) que possuem em sua estrutura uma porção polar (grupo carboxilato) e uma porção pouco polar, composta pela cadeia carbônica longa do material de origem. Esses sais podem ser protonados por catálise ácida gerando ácidos graxos, que em etapas posteriores podem ser transformado sem monoésteres alquílicos através da reação de esterificação ácida descrita no item 2.1.2. Assim, esse processo combinado pode representar uma opção para síntese de monoésteres alquílicos (CLAYDEN, 2012). A FIGURA 6 apresenta uma rota catalítica para obtenção de ácido graxo a partir de uma molécula de triacilglicerol.

FIGURA 6 -ROTA PARA SÍNTESE DE ÁCIDO GRAXO APÓS REAÇÃO SE SAPONIFICAÇÃO



FONTE: CLAYDEN (2012)

## 2.2 FONTES DE TRIACILGLICEROIS PARA APLICAÇÃO EM BIODIESEL

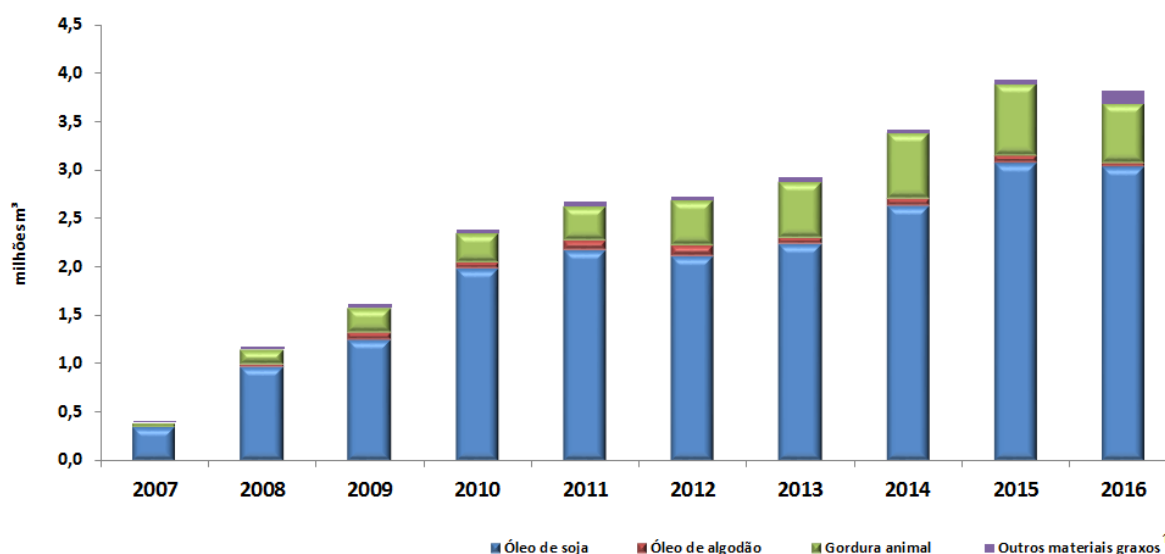
O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de biodiesel, com uma produção anual de cerca de 4 milhões de metros cúbicos em 2016 a partir de 51 plantas produtoras deste biocombustível (ANP, 2017).

Conforme dados divulgados pela ANP (FIGURA 7), a principal matéria-prima para síntese de biodiesel no país ainda é a soja, que ocupa posição de destaque principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sul, onde corresponde a 83% e 70% do total de material processado pelas empresas produtoras de biodiesel. Isso se dá porque o país é desenvolvido no que se refere à produção, cultivo e comercialização da soja. Entretanto, existem discussões quanto à viabilidade da utilização deste grão para este fim devido à preocupação de organismos internacionais com uma possível crise no mercado mundial de gêneros alimentícios, causada por se direcionar áreas destinadas à produção de alimentos para a produção de matérias-primas para biocombustíveis (CHISTI, 2007; MAKAREVIČIENE *et al.*, 2014; SUAREZ *et al.*, 2009; SUGANYA *et al.*, 2016). Dados do Banco Mundial atribuíram a isso o aumento no preço de produtos alimentícios ocorridos entre os anos de 2006 e 2008 (MAKAREVIČIENE *et al.*, 2014).

Outro aspecto negativo a respeito do uso da soja é a necessidade de grandes extensões de terras aráveis para seu cultivo, além de sua baixa produtividade em óleo quando comparada a outras fontes de lipídios (TABELA 1, p.27) e de altos custos vinculados ao consumo de fertilizantes e água (CHISTI,

2007; SUAREZ *et al.*, 2009;). Nesse contexto, novas pesquisas se fazem necessárias para identificar matérias-primas mais promissoras, ou seja, que apresentem maior produtividade, que ocupem menores áreas e que não afetem negativamente o mercado de alimentos (SUAREZ *et al.*, 2009).

FIGURA 7 -PRINCIPAIS FONTES DE TRIACILGLICEROIS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL



FONTE: ANP (2017)

LEGENDA:<sup>1</sup>Inclui óleo de palma, óleo de amendoim, óleo de nabo-forrageiro, óleo de girassol, óleo de mamona, óleo de sésamo, óleo de fritura usado e outros materiais graxos.

A TABELA 1 demonstra a baixa produtividade em óleo da soja em relação a outras fontes de triacilgliceróis como canola, palma e microalgas. A partir desses resultados nota-se que as microalgas são matérias-primas úteis para a produção de biodiesel, já que ocupam áreas muito menores e apresentam maiores teores de material graxo. Como exemplos encontram-se citadas a *Botryococcus braunii*, que pode ser considerada como uma espécie de elevada produtividade (cerca de 80%), e outros gêneros como *Chlorella* e *Dunaliella*, que apresentam produtividade média. Devido a esta capacidade produtiva e tendo por referência os dados apresentados na TABELA 1, verifica-se que a necessidade de área para produção de biodiesel é muito menor para microalgas, se comparadas a outras fontes de lipídios (HALIM *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2015). Além disso, esses organismos podem ser cultivados em ambientes que seriam impróprios para agricultura, como água marinha ou águas

residuais contaminadas com efluentes industriais ou patógenos, por exemplo (MATA *et al.*, 2010; MENEZES, 2015).

Suganya *et al.* (2016) e Mata *et al.* (2010) destacaram outras vantagens para o uso de microalgas na produção de biodiesel, como, por exemplo, a facilidade no cultivo destes microrganismos, menores custos de produção se comparados ao cultivo da soja e elevada capacidade de absorção do CO<sub>2</sub> atmosférico devido ao processo de fotossíntese. Algumas espécies de algas são capazes de fixar CO<sub>2</sub> atmosférico com eficiência 50 vezes maior que algumas plantas superiores, possibilitando redução na disponibilidade deste gás e minimização de problemas ambientais como o aumento do aquecimento global (SUGANYA *et al.*, 2016).

Ainda são citadas como vantagens o crescimento rápido desses microrganismos (MAKAREVIČIENE *et al.*, 2014), que são capazes de dobrar a quantidade de biomassa em 24 h, e a possibilidade de destinar a biomassa após a extração do óleo para outras aplicações como a produção de bioetanol e a extração de pigmentos e compostos bioativos (MATA *et al.*, 2010; SUGANYA *et al.*, 2016). Todas as vantagens aqui citadas demonstram a necessidade de se estudar cada vez mais as microalgas para aproveitar ao máximo o seu potencial de aplicação.

TABELA 1 - PRODUTIVIDADE DE ÓLEO DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS PARA BIODIESEL

Fonte de lipídio	Conteúdo de óleo (% na biomassa seca)	Rendimento em óleo (L óleo/ha ano)	Área necessária (m <sup>2</sup> ano / Kg biodiesel)	Produtividade de biodiesel (Kg de biodiesel/ ha ano)
Milho	44	172	66	52
Soja	18	636	18	562
Canola	41	974	12	862
Palma	36	5.366	2	4.747
Mamona	48	1.307	9	1.156
Microalga(baixo teor de óleo)	30	58.700	0,2	51.927
Microalga(médio teor de óleo)	50	97.800	0,1	86.515
Microalga(alto teor de óleo)	70	136.900	0,1	121.104

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

### 2.3 MICROALGAS

O termo microalgas é abrangente e não tem valor taxonômico, pois se refere a um grupo heterogêneo de organismos unicelulares, fotossintéticos, encontrados isoladamente ou em grupos, com tamanho variável e capacidade de se desenvolverem em ambientes variados como solo, água marinha ou água doce (DERNER *et al.*, 2006; MENEZES, 2015; SILVA, 2013; SUGANYA *et al.*, 2016). Estima-se que existam mais de 200 mil espécies de microalgas e estas podem ser agrupadas de acordo com a seguinte classificação: (a) Chlorophyceae (algas verdes), que são eucarióticas e em sua maioria têm habitat natural em água doce; (b) Bacillariophyceae (diatomáceas), que apresentam sílica em sua parede celular e são frequentemente localizadas em ambientes marinhos; (c) Xanthophyceae (algas amarelas esverdeadas), grupo com cerca de apenas 600 espécies de parede celular rígida; (d) Chrysophyceae (algas douradas), cujos pigmentos principais são as fucoxantinas e os carotenoides; (e) Rhodophyceae (algas vermelhas), que são encontradas em ambiente marinho ligadas a rochas ou a outras algas; (f) Phaeophyceae (algas pardas), mais comumente encontradas em água doce e em regiões polares, e (g) Cyanophyceae (cianobactérias), que possuem estrutura celular próxima à das bactérias (CURTIS, 1989; DERNER *et al.*, 2006; GAUTAM *et al.*, 2017; MENEZES, 2015; SUGANYA *et al.*, 2016).

O crescimento destes seres vivos, assim como o teor de lipídios presentes em sua estrutura celular, pode ser afetado pelas condições empregadas em seu cultivo. Entre os parâmetros mais relevantes destacam-se a incidência de luz e a quantidade de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) disponível para o processo de fotossíntese, assim como pH, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro, entre outros (CONVERTI *et al.*, 2009; MATA *et al.*, 2010). As microalgas são sensíveis a pequenos acréscimos na temperatura de cultivo e a sua elevação em até 2°C acima da condição considerada ótima para o seu desenvolvimento pode acarretar até mesmo na perda do cultivo, dependendo da espécie em questão (MATA *et al.*, 2010).

O controle na disponibilidade de nutrientes é crucial para a multiplicação e para o acúmulo de lipídios em microrganismos. Em situações de redução na quantidade de nutrientes, como nitratos e fosfatos, o metabolismo das microalgas armazena energia na forma de lipídios neutros que são úteis para síntese de

biodiesel (MATA *et al.*, 2010; ZIENKIEWICZ *et al.*, 2016). Este fato foi observado nos estudos realizados por Sobczuk *et al.* (2010) com a microalga *Choricystis minor*, em que fosfatos e nitratos foram reduzidos no meio de cultivo gerando aumentos de até 60% na produção de lipídios, assim como por Nigam *et al.* (2011) com a microalga *Chlorella pyrenoidosa*, em que a quantidade máxima acumulada de lipídios (26%) foi obtida com a menor concentração de nitrato de potássio no meio ( $0,05 \text{ gL}^{-1}$ ). Converte *et al.* (2009) também observaram que a redução de 75% na concentração de nitratos permitiu que as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* acumulassem duas vezes mais lipídios. Apesar do incremento obtido na quantidade de lipídios, condições adversas provocam decréscimo na taxa de multiplicação das microalgas e, por esta razão, Sobczuk *et al.* (2010) sugeriram a realização do cultivo em dois estágios. Na primeira etapa se submete os microrganismos às condições ideais para seu desenvolvimento, propiciando o acúmulo de biomassa e, posteriormente, recomenda-se a redução na disponibilidade de nutrientes por alguns dias para provocar um aumento na taxa de acúmulo de lipídios. Outras condições de estresse podem provocar o aumento no acúmulo de lipídios, como mudanças de temperatura e na incidência de luz (D’ALESSANDRO *et al.*, 2016).

Diferentes condições de cultivo e espécies de microalgas podem gerar biomassa com teores de óleo distintos. Por esta razão, alguns estudos têm sido realizados com o intuito de se determinar as melhores condições para cada espécie, bem como identificar a espécie mais adequada para produção de biodiesel. Na TABELA 2 é possível verificar a variação no teor lipídico de algumas espécies de microalgas.

TABELA 2- CONTEÚDO LIPÍDICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS

<b>Espécie de microalga</b>	<b>Conteúdo lipídico (%)</b>
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	7,9 – 20,5%
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75%
<i>Chlorella</i> sp.	28-32%
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58%
<i>Scenedesmus obliquus</i>	14-12%
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 -40%

FONTE: adaptado de PEREIRA *et al.* (2012) e D’ALESSANDRO *et al.* (2016)

Entre as espécies de microalgas verdes que podem ser citadas como possíveis fontes de material graxo para síntese de biodiesel está a *Choricystis minor* var. *minor*. Esta microalga dulcícola foi isolada do Rio Madeira em Rondônia e os resultados de Menezes (2015) indicaram que sua produtividade em ésteres após aplicação da metodologia de Hartman e Lago é cerca de 11 vezes maior que a da soja.

Estudos de Menezes *et al.* (2016) verificaram a influência dos meios de cultivo BBM (Bold's Basal Medium) e WC (Wright's Cryptophyte) sobre o crescimento e composição química da microalga *Choricystis minor* var. *minor*. Esses meios de cultivo são compostos por diferentes concentrações de nutrientes como nitratos de sódio e cobalto, cloretos de cálcio, manganês e ferro, fosfato de potássio e sulfatos de zinco e ferro, sendo que o meio BBM apresenta níveis de concentração mais elevados destes nutrientes do que o meio WC. Tal diferença na composição dos meios e, conseqüentemente, na disponibilidade de nutrientes, provocou alterações no perfil lipídico da microalga, sendo que sua composição em ácidos graxos insaturados foi maior ao se utilizar o meio de cultivo BBM.

Menezes *et al.* (2013) compararam o rendimento em éster da microalga *Choricystis sp.* com os das microalgas dulcícolas *Kirchneriella lunaris*, *Kirchneriella irregularis*, *Monoraphidium komarkovae* e *Tetranephris brasiliensis*. Os dados obtidos demonstraram que a *Choricystis sp.* apresentou teor de éster superior às demais microalgas, além de um perfil lipídico com proporção adequada entre ácidos graxos saturados e insaturados para aplicação em biodiesel. A proporção de ácidos graxos é de suma importância, pois elevados teores de ácidos graxos insaturados levam a um biodiesel de menor estabilidade oxidativa, assim como grandes proporções de ácidos graxos saturados comprometem as suas propriedades de fluxo a frio, causando problemas no bom funcionamento dos motores (LOBO *et al.*, 2009).

Menezes *et al.* (2013) também demonstraram que as microalgas *Kirchneriella lunaris*, *Kirchneriella irregularis*, *Monoraphidium komarkovae* e *Tetranephris brasiliensis* apresentaram perfis lipídicos semelhantes no que se refere à elevada quantidade de ácido palmítico (C16:0), com percentual variando entre 24,7 e 35,6%, além da presença dos ácidos graxos Tetradecanóico (mirístico, C14:0), 9-Hexadecenoico (palmitoleico, C16:1 Z9), 11-hexadecenoico (C16:1 Z11),

7,10-hexadecadienoico (C16:2 Z7,Z10),9-heptadecenoico (C17:1 Z9), octodecanoico (esteárico, C18:0), 9-Octadecadienoico (oleico, C18:1 Z9), 11-octadecenoico (vacênico, C18:1 Z11) e 9,12-octadecadienoico (linoleico, C18:2 Z9, Z12).

A composição de ácidos graxos também pode ser influenciada pelas condições de cultivo. Assim, dados da literatura podem apresentar grande variação a respeito do perfil lipídico de uma espécie de microalga, como observado por Menezes *et al.* (2015) ao compararem os seus resultados com os de Sobczuk *et al.* (2010) para a microalga *Choricystis minor var. minor*. Embora os dois trabalhos demonstrem a predominância do ácido palmítico, o teor de ácido linoleico (C18 :2 Z9, Z12) apresentou grande variação. Enquanto no estudo de Sobczuk *et al.* (2010) este ácido atingiu valores de 30 g 100 g<sup>-1</sup> de lipídios, o trabalho de Menezes *et al.* (2015) revelou um valor máximo de 9,6 g 100 g<sup>-1</sup>. Apesar destas diferenças, as duas referências indicam que a *Choricystis minor var. minor* é uma espécie com potencial para ser aplicada para a produção de biodiesel.

#### 2.4 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO

Um dos desafios a ser superado para tornar viável a produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas em larga escala é o desenvolvimento de processos eficientes de extração do material lipídico. A constituição da fração lipídica das microalgas é muito variada, apresentando tanto lipídios neutros (ácidos graxos e triacilgliceróis) que são utilizados pelas células para armazenar energia, como lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios) que compõem a membrana celular. Além destes compostos existem ainda outras substâncias presentes na biomassa de microalgas, como esteróis, cetonas, carotenoides e clorofilas (VIÊGAS, 2010; HALIM *et al.*, 2012). Todavia, esses compostos podem ser extraídos pelos mesmos solventes empregados para extrair os lipídios de interesse para síntese de biodiesel. Por esta razão, deve-se definir um solvente ou uma combinação de solventes de boa seletividade e altos rendimentos de extração, mais especificamente, para ácidos graxos e triacilgliceróis, mas que também apresente baixo custo, disponibilidade imediata e baixa toxicidade (HALIM *et al.*, 2012).

Em escala laboratorial, a realização de testes de extração utilizando diferentes solventes orgânicos em aparato Soxhlet é bastante comum (FIGURA 8). Nesse sistema o solvente é aquecido até sua temperatura de ebulição para em

seguida sofrer condensação e entrar em contato com a amostra. Após o acúmulo de solvente condensado exceder a capacidade do extrator, o solvente contendo o extrato retorna ao balão de aquecimento por sifonação. Então, o solvente é novamente evaporado e condensado, completando o ciclo de extração e promovendo o acúmulo de óleo no balão (HALIM *et al.*, 2012; BRANDALIZE, 2014; CASTRO *et al.*, 2009). Esse tipo de sistema é utilizado em métodos analíticos para determinação de lipídios por propiciar uma extração exaustiva, que ocorre de forma contínua com a constante renovação do solvente a cada ciclo de extração. Além disso, o método apresenta algumas vantagens como baixo custo para montagem do sistema, fácil manipulação e dispensa a etapa de filtração para separação da matriz do extrato; entretanto, há alguns aspectos negativos como expor o extrato à temperaturas elevadas (temperatura de ebulição do solvente), o que pode causar a decomposição de compostos termolábeis e o uso de grandes quantidades de solvente em longos períodos de extração (CASTRO *et al.*, 2009).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO APARATO SOXHLET



Os tempos de extração podem variar conforme a matriz ou metodologia selecionada. Na TABELA 3 estão listados trabalhos de diferentes autores que utilizaram tempos de extração entre 12 a 18 h para diferentes espécies de microalgas.

Brandalize (2014), Baumgardt *et al.* (2016) e Batista (2016) utilizaram extração em Soxhlet para avaliar a capacidade de diferentes solventes em extrair o óleo de diferentes microalgas e os resultados obtidos foram utilizados como

referência para avaliar a eficiência de outros métodos de extração como o ultrassom e a aplicação de ciclos seqüenciais de compressão e descompressão.

TABELA 3 - ESTUDOS SOBRE O USO DE DIFERENTES SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGAS

Espécie de microalga	Solvente	Extração (%)	Tempo (h)	Referência
	Hexano	4,8	12	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Clorofórmio:metanol (2:1 v/v)	18,1	12	Baumgardt <i>et al.</i> (2016)
	Etanol	19,2	12	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Hexano	2,7	12	Batista (2016)
	Etanol	15,7	12	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Hexano	1,7	12	Brandalize (2014)
	Etanol	11,9	12	
<i>Shizochytrium limacinum</i>	Hexano	45	18	Tang <i>et al.</i> (2011)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Hexano	5,8	18	Liau <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Etanol	40,9	18	Liau <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Éter de petróleo	8,2	18	Converti <i>et al.</i> (2009)

Os dados da TABELA 3 indicam que o hexano é capaz de extrair uma menor quantidade de material das microalgas devido a sua seletividade para lipídios neutros independentemente do período de extração utilizado, enquanto que o etanol apresenta rendimento muito mais elevado para a mesma espécie de microalga. A massa de extrato obtida para diferentes espécies revela que suas respectivas constituições lipídicas são muito distintas. Por isso se justifica a necessidade de estabelecer a melhor combinação de solventes para cada espécie, a fim de se otimizar o rendimento do processo de extração.

Baumgardt *et al.* (2016) avaliaram o perfil graxo dos extratos e os rendimentos de extração da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* com os solventes etanol, hexano e a mistura de solventes clorofórmio: metanol na proporção 2:1(v/v). Os resultados obtidos indicaram o etanol anidro como melhor solvente para este

sistema de extração, já que esse apresentou rendimentos em massa de óleo superiores ao hexano e semelhantes à mistura clorofórmio:metanol, com a vantagem de ser um solvente menos tóxico se comparado aos demais.

É recorrente na literatura o uso do sistema de solvente clorofórmio:metanol para extração de lipídios de microalgas e esse tem servido como um padrão de comparação com outros métodos de extração, por se tratar de uma mistura de solventes com polaridades distintas permitindo a extração de lipídios polares e apolares de amostras de microalga. Esse procedimento foi adotado não só por Baumgardt *et al.* (2016) como também por Lee *et al.* (1998), que compararam o rendimento de extração do óleo da microalga *Botryococcus braunii* utilizando os solventes clorofórmio: metanol (2:1 v/v), acetona: diclorometano (1:1v/v) e hexano: isopropanol (3:2 v/v), sendo que o melhor rendimento foi obtido com a mistura clorofórmio: metanol. Da mesma forma, Viêgas (2010) avaliaram a influência dos solventes clorofórmio:metanol (2:1 v/v), metanol, clorofórmio e etanol em três tipos de sistema: agitação magnética, ultrassom e Soxhlet, para extração do óleo da microalga dulcícola *Chlorella pyrenoidosa*. Nesse trabalho, o melhor rendimento de extração (aproximadamente 20%) foi obtido com a mistura clorofórmio:metanol sob agitação magnética.

Os dados apresentados por Baumgardt *et al.* (2016) demonstraram que o uso de diferentes solventes pode afetar as características químicas dos extratos obtidos, no que se refere à capacidade de conversão da porção extraída em ésteres. Extratos obtidos em etanol e clorofórmio: metanol, após serem submetidos à saponificação seguida de esterificação pelo método Hartman e Lago (BAUMGARDT *et al.*, 2016; MENEZES *et al.*, 2013), apresentaram teores de ésteres totais de, respectivamente, 23,6 e 15,4 g por 100g de extrato, valores bastante distintos do alcançado pela extração com hexano (54,6 g 100 g<sup>-1</sup>). Porém, ao se considerar o rendimento em éster em relação à massa de microalgas, o etanol se mostrou mais eficiente como o solvente de extração, já que foi possível obter 11,33 g de éster por 100 g de biomassa seca.

O emprego da combinação entre clorofórmio e metanol está relacionado às bases do método analítico desenvolvido por Bligh e Dyer (1959), que é um método gravimétrico baseado na extração de lipídios na temperatura ambiente utilizando a mistura clorofórmio: metanol: água na proporção volumétrica de 1:2:0,8. Após

agitação do recipiente contendo a amostra em contato com a mistura de solventes, aguarda-se a separação de fases para em seguida realizar a transferência da fase clorofórmica contendo os lipídios extraídos para um recipiente de massa conhecida. Posteriormente, o clorofórmio é removido por evaporação e o percentual de lipídios totais da amostra é calculado por diferença de massas. Embora utilizado como referência para se determinar a eficiência de diferentes processos de extração, esse método tem pouca aplicabilidade prática em processos industriais devido à elevada toxicidade dos solventes empregados, o que geraria grandes riscos à segurança das pessoas envolvidas na sua execução. Os autores Baumgardt *et al.* (2016) e Viêgas (2010) avaliaram o uso da mistura clorofórmio:metanol (2:1) para processos de extração, todavia não utilizaram a água conforme descrito na metodologia Bligh e Dyer pois não havia interesse em se promover separação das fases durante os processos.

Na busca por solventes que apresentem menor impacto ambiental e que também possibilitem maior rendimento de extração em intervalos de tempo menores, alguns autores (BAUMGARDT *et al.*, 2016; JESUS *et al.*, 2013; CORSO *et al.*, 2010) têm estudado o uso de gases pressurizados como propano e dióxido de carbono.

## 2.5 EXTRAÇÃO COM FLUIDO PRESSURIZADO.

Processos de extração utilizando solventes pressurizados em condições subcríticas ou supercríticas têm apresentado grande potencial para extração de lipídios de diferentes tipos de matérias-primas, incluindo as microalgas (BAUMGARDT *et al.*, 2016; MOUAHID *et al.*, 2016). Esse potencial está relacionado com as características intermediárias entre líquido e gás adquiridas por esses fluidos ao serem submetidos às suas temperatura e pressão críticas. Nessas condições, não é possível notar separação entre as fases líquida e gasosa do fluido empregado, que passa a apresentar densidade semelhante à dos líquidos, além de permitir que essa seja modulada ao se ajustar a pressão e temperatura, aumentando a capacidade de solvatação, e viscosidade, difusividade e tensão superficial semelhantes às de um gás, o que aumenta a capacidade de penetração do fluido na matriz, facilitando o acesso aos constituintes da amostra durante o processo de extração (HALIM *et al.*, 2012; SANTANA *et al.*, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2001; MESOMO, 2013).

Uma das vantagens do uso dessa classe de solventes é a facilidade de remoção do mesmo após a extração, pois ao sofrer expansão durante o processo de despressurização o solvente retorna ao estado gasoso, não sendo necessários tratamentos posteriores para separação entre o solvente e o produto final. Já no processo de extração convencional, o solvente precisa ser totalmente removido por evaporação (BENELLI, 2010; MEIRELES, 1999). Essa propriedade permite a remoção do solvente da matéria-prima, o que torna possível a aplicação desta matriz, após a extração, em outras áreas como ração animal.

As condições empregadas no processo de extração supercrítica dependem da escolha do solvente. Na TABELA 4 estão apresentadas as temperaturas e pressões críticas de uma variedade de substâncias que podem ser empregadas neste tipo de processo.

TABELA 4 - CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO CRÍTICAS PARA DIFERENTES SOLVENTES

Substância	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (MPa)
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	31	7,29
Água	374	21,72
Etano	32	4,82
Propano	97	4,19
Metanol	240	7,99
Etanol	241	6,06

FONTE: adaptado de BENELLI (2010)

Entre as substâncias listadas na TABELA 4, CO<sub>2</sub> é a mais comumente utilizada por se tratar de um gás não tóxico e não inflamável que apresenta condições moderadas de pressão (7,29 MPa) e temperatura (31°C) para alcançar o estado supercrítico. Ademais, o CO<sub>2</sub> é inerte, apresenta baixo custo e pode ser obtido em grande escala como subproduto da indústria alcooleira (RAVEEDRAN *et al.*, 2004). Além disso, é possível recuperar o gás ao final da extração e reutilizá-lo no mesmo sistema. Desta maneira, pode-se afirmar que este processo não contribui para problemas ambientais como o efeito estufa, já que o gás não seria liberado na atmosfera (NALAWADE *et al.*, 2006).

O dióxido de carbono supercrítico é considerado um solvente pouco polar que é útil para extração de material lipofílico. No entanto, o seu poder de solvatação pode ser modulado ao serem variadas as condições de temperatura e pressão do sistema de extração (SOUZA, 2015).

O processo de extração supercrítica ocorre em cinco etapas, conforme demonstrado na FIGURA 9. Na primeira etapa a matriz adsorve o solvente, o que acarreta na dilatação das membranas celulares e canais que a compõem, reduzindo a resistência à transferência de massa. Paralelamente ocorre a etapa 2, que consiste na dissolução dos compostos no solvente e seu transporte por difusão até a superfície do material, levando à formação de um fino filme líquido sobre as partículas que compõem o leito. Na etapa 3 o extrato é solubilizado e transportado para o fluido supercrítico e, nas etapas posteriores, ocorre a difusão e dessorção do extrato pelos poros até esse ser transportado para a fase contendo o fluido supercrítico (GUINDANI, 2014; SILVA, 2012).

FIGURA 9 - ESQUEMA PARA DESCRIÇÃO DA EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO

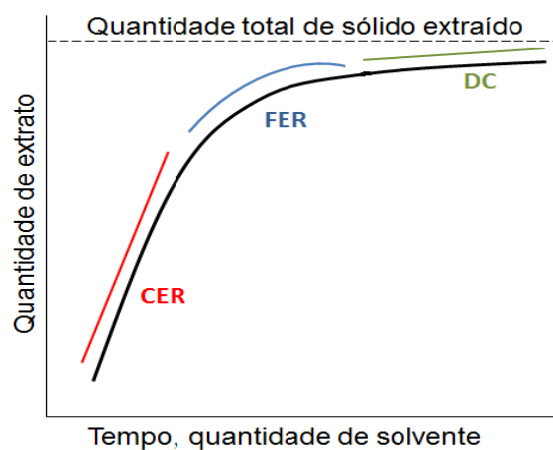


FONTE: SILVA (2012)

Processos extrativos empregando a tecnologia supercrítica podem ser representados por curvas de extração, que são determinadas pela quantidade de extrato obtido em função do tempo ou do volume de solvente (BENELLI, 2010; LIVIA, 2013; BUNNER, 1994 *apud* CORREA, 2016). Em geral, essas curvas são divididas em 3 regiões que representam as três fases da extração (FIGURA 10). Na primeira etapa, a taxa de extração é constante (CER, *constant extraction rate*) e

assim representada graficamente por uma reta (FIGURA 10). Nessa, a superfície das partículas está recoberta por uma fina camada de extrato e a inclinação da curva refere-se à solubilidade do extrato no solvente. O rendimento dessa fase pode alcançar cerca de 50% do rendimento global da extração (CORREA, 2016; CZAIKOSKI, 2014; LIVIA, 2013). Na segunda etapa, a taxa de extração é decrescente (FER, *falling extraction rate*) e essa diminuição ocorre porque a quantidade de partículas recobertas pelo extrato diminui. Ao término dessa fase, o rendimento de extração pode alcançar valores próximos a 70% do rendimento final do processo (CORREA, 2016; CZAIKOSKI, 2014; LIVIA, 2013). A última etapa é denominada etapa controlada pela difusão (DC, *diffusion controlled*) e corresponde à fase em que o soluto não está mais facilmente disponível para interação com o solvente, ou seja, não existe extrato sobre as partículas do leite. A extração passa a ocorrer principalmente pela difusão do fluido para o interior das partículas e pela dispersão do extrato na superfície da partícula (CORREA, 2016; LIVIA, 2013; FERREIRA *et al.*,1999).

FIGURA10- CURVA DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDO PRESSURIZADO



LEGENDA: CER - *constant extraction rate*(taxa de extração constante); FER - *falling extraction rate*(taxa de extração decrescente); DC - *diffusion controlled*(etapa controlada por difusão)

### 2.5.1 Extração com fluido pressurizado de óleo de microalgas.

O CO<sub>2</sub> supercrítico (sc-CO<sub>2</sub>) tem sido utilizado para extração de uma variedade de espécies de microalgas. Santana *et al.* (2012), investigaram o uso de CO<sub>2</sub> nas temperaturas de 50 e 80°C e em pressões variando de 200 a 250 bar para

extração de óleo da microalga *Botryococcus braunii*. Para essa matéria-prima, a melhor extração se deu a 50 °C e 250 bar para um rendimento mássico obtido de aproximadamente 10% após 10 min de extração. Milao *et al.* (2016) avaliaram o efeito das variáveis pressão e temperatura sobre o rendimento de extração de óleo e de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana*, com maior rendimento de extração na condição de 64 °C e 59,3 MPa. Outras condições para uso do CO<sub>2</sub> são apresentadas na TABELA 5 para diferentes espécies de microalgas.

TABELA 5 - ESTUDOS SOBRE O USO DE sc-CO<sub>2</sub> COMO SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO DE MATERIAL LIPÍDICO DE MICROALGAS.

<b>Espécie de microalga</b>	<b>Condições otimizadas</b>	<b>Rendimento mássico de extração (%)</b>	<b>Cossolvente empregado/ quantidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	150 bar, 80 °C	5,1%	Etanol 1:1 em relação à massa de microalga	Baumgardt <i>et al.</i> (2016)
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	250 bar, 80 °C	1%	Ausente	Baumgardt <i>et al.</i> (2016)
<i>Scenedesmus sp.</i>	500 bar, 53 °C	7,41%	Ausente	Taher <i>et al.</i> (2014)
<i>Botryococcus braunii</i>	250 bar, 50 °C	10%	Ausente	Santana <i>et al.</i> (2012)

Solana *et al.* (2014) avaliaram o rendimento de extração do material lipídico das microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* e *Nannochloropsis salina* utilizando também o etanol como cossolvente na concentração de 5% em relação à massa de CO<sub>2</sub> empregada na extração. Nesse trabalho, o rendimento máximo foi alcançado nas condições de 60 °C e 300 bar, sendo que a microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou o melhor desempenho de extração (24,7%).

Uma das vantagens do uso do cossolvente é a redução significativa no tempo de extração. Tang *et al.* (2011), obtiveram rendimento de 45% após 8h de extração em Soxhlet da microalga *Schizochytrium limacinum*, mas ao submeter a mesma amostra a uma extração com sc-CO<sub>2</sub> e etanol nas condições de 350 bar e 40 °C, o rendimento obtido foi de 33,9% após 30 min. Outros dados (TABELA 5)

revelam que diferentes condições de temperatura, pressão, quantidade de cossolvente utilizada podem gerar rendimentos de extração distintos para diferentes espécies de microalgas, sendo necessários estudos para se avaliar qual o conjunto de condições ideais para maximizar os rendimentos experimentais.

O gás propano pressurizado também tem sido estudado como solvente para extração de material lipídico de algumas matrizes. Corso *et al.* (2010) utilizaram este gás para extração de óleo de semente de gergelim e para esta matriz a extração foi mais veloz se comparada à extração com CO<sub>2</sub> em condições supercríticas. Resultados semelhantes a esse foram verificados por Pedersetti (2008) ao estudar a extração do óleo de canola e por Nimet *et al.* (2011) ao avaliar o rendimento da extração de óleo de semente de girassol. Estes estudos indicam que o propano é mais eficiente que o CO<sub>2</sub> na extração de óleos vegetais. No entanto, poucos estudos foram orientados ao uso do gás propano na extração de óleo de microalga.

Baumgardt *et al.* (2016), demonstraram que o uso do propano pressurizado proporcionou um rendimento mássico aproximadamente duas vezes maior que as extrações utilizando CO<sub>2</sub>, tanto na ausência quanto na presença de etanol. A condição que propiciou o maior rendimento mássico (cerca de 9%) foi a que empregou propano e etanol (proporção 1:1 em relação à massa de biomassa) na pressão de 250 bar e 80 °C. Entretanto, quando esses autores avaliaram a conversão do extrato em monoésteres de metila, essa condição apresentou um teor de ésteres totais de cerca de 26 g 100 g<sup>-1</sup>, resultado inferior à condição que propiciou o maior rendimento mássico de extração com CO<sub>2</sub>, cujo valor de conversão em éster foi de 41,5 g 100 g<sup>-1</sup>.

Segundo Oncel (2013), houve um aumento significativo no número de publicações a respeito das microalgas de 2004 a 2012, que foi seguido por uma redução de cerca de 1200 publicações em 2012 para aproximadamente 300 publicações em 2013. Apesar desse decréscimo nos últimos anos, existem mais de 60 empresas no mundo que utilizam as microalgas como matéria-prima para síntese de biocombustíveis, sendo que a maioria está localizada nos Estados Unidos da América, país que detém a maior parte das publicações na área. Estas informações indicam a relevância de se desenvolver pesquisas para a seleção das espécies adequadas, além de se estabelecer métodos de extração que propiciem rendimentos elevados em menor tempo. Entre as espécies ainda pouco estudadas e

indicadas como adequadas para síntese de biodiesel está a *Choricystis minor* var. *minor* (SOBCZUK *et al.*, 2013; MENEZES *et al.*,2016), que foi o objeto de estudo desse trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a cinética e o rendimento do processo de extração do óleo da microalga *Choricystis minor* var. *minor*, empregando diferentes solventes em diferentes condições de extração.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar o rendimento da extração convencional (Soxhlet) utilizando solventes de diferentes polaridades.
- II. Acelerar o processo de extração do óleo da microalga empregando dióxido de carbono em estado supercrítico e propano liquefeito.
- III. Estudar o efeito sobre o rendimento e a cinética dos processos de extração com solventes pressurizados adicionando-se etanol e hexano como cossolvente.
- IV. Avaliar o efeito do uso de diferentes solventes pressurizados, na presença ou não de cossolvente, sobre rendimento de conversão do óleo de microalga em monoésteres metílicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo são apresentados os materiais utilizados e metodologia adotada para caracterização da matéria-prima quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas e teor de ésteres totais, assim como os métodos para determinação do perfil lipídico e teor de ésteres passíveis de serem obtidos a partir dos extratos oriundos da extração convencional (Soxhlet) e com fluidos pressurizados, associados ou não aos cossolventes hexano e etanol.

### 4.1 MATERIAIS

A espécie de microalga utilizada foi a *Choricystis minor* var. *minor* fornecida pelo Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras foram obtidas após centrifugação e mantidas congeladas até o seu uso. Os solventes utilizados nas extrações foram: etanol P.A, hexano P.A e metanol P.A. adquiridos da Neon, clorofórmio P.A. fornecido pela Dinâmica, e dióxido de carbono e propano (99,5%) adquiridos junto à White Martins.

Para execução do método de Hartman e Lago adaptado (MENEZES *et al.*,2013), que se refere à esterificação do material lipídico presente nos extratos, foram utilizados os seguintes reagentes: hidróxido de sódio (Vetec), cloreto de amônio (Vetec), heptano (Neon) e ácido sulfúrico (Merck), todos com a especificação P.A.. Os padrões cromatográficos de monoésteres metílicos (Supelco FAME Mix C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>) foram adquiridos da Sigma.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo de amostra.

A produção da biomassa foi realizada no Laboratório de Cultivo de Algas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em tanques de 500L contendo o meio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM), sob condições naturais de iluminação, temperatura e agitação constante. Após centrifugação (6.000 xg) a biomassa foi congelada a -20°C em tabletes, que foram transportados por transporte rodoviário até a Universidade Federal do Paraná (UFPR). A fim de gerar um único lote, esses tabletes foram descongelados em temperaturas entre 6 e 10°C, transferidos para um

recipiente de vidro e homogeneizados com auxílio de um bastão de plástico. Posteriormente, o material foi acondicionado em embalagens plásticas e congelado novamente até o seu uso.

#### 4.2.2 Secagem.

As amostras *in natura* foram descongeladas e aplicadas sobre a superfície retangular de um recipiente de vidro, que foi submetido à secagem a 50 °C em estufa com circulação de ar (Labstore) por 12 h. Em seguida, a amostra foi retirada por raspagem e moída em um liquidificador. Esta amostra também foi acondicionada em frascos de vidro e mantida sob refrigeração até o seu uso.

#### 4.2.3 Determinação de umidade.

As determinações dos teores de umidade de amostras de microalga *in natura* e seca em estufa foram realizadas em triplicata empregando-se a seguinte metodologia: cerca de 200 mg para as amostras seca em estufa e 2 g para amostras *in natura* foram pesados em cápsulas de porcelana previamente limpas e secas. Em seguida, o material foi mantido em estufa a 105 °C até massa constante. Os resultados foram calculados pela Equação 1 e expresso em % (m/m),

$$\text{Umidade (\%)} = (100 \times N)/M \quad \text{Equação 1}$$

onde N é a perda de massa em gramas e M é a massa inicial da amostra.

#### 4.2.4 Análise de cinzas ou resíduos por incineração.

Cerca de 2 g da amostra seca em estufa foram pesados em cadinhos de porcelana previamente limpos, calcinados e tarados. Em seguida, as amostras foram carbonizadas em manta de aquecimento e transferidas para mufla, onde foram mantidas por 4 h a 550 °C. Posteriormente, os cadinhos foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. Os resultados foram calculados conforme a Equação 2 e expressos em % (m/m),

$$\text{Cinza (\%)} = (100 \times N)/M \quad \text{Equação 2}$$

onde N é a massa de cinzas em gramas e M é a massa inicial de amostra.

#### 4.2.5 Determinação de teor de proteínas.

O teor de proteínas foi determinado pelo método clássico de Kjeldahl (IAL, 2008). Inicialmente, a mistura catalítica foi preparada contendo dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro na proporção mássica 0,3:0,3:6. Então, aproximadamente 0,5 g da biomassa de microalga foram transferidos para um balão de Kjeldahl de 500 mL. Em seguida, adicionou-se 20 mL de ácido sulfúrico concentrado e 4 g da mistura catalítica preparada previamente. O balão foi aquecido no digestor até a solução se tornar azul esverdeada (aproximadamente 2 h). Posteriormente, o balão foi resfriado e adicionou-se 150 mL de água destilada. A saída do condensador do sistema de digestão foi mergulhada em um béquer de 250 mL contendo 25 mL de uma solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 3 gotas do indicador vermelho de metila (1% m/v). Foram ainda transferidos para o balão de digestão aproximadamente 80 mL de uma solução de hidróxido de sódio 40%, seguida da adição de 1 g de zinco em pó. O balão foi conectado ao sistema de destilação imediatamente após a adição do zinco, o volume do destilado foi recolhido e depois titulado com uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH até coloração amarela. O teor de proteínas foi calculado pela Equação 3,

$$\text{Proteína (\% m/m)} = (V \times 0,14 \times 6,25) / M \quad \text{Equação 3}$$

onde V é a diferença entre o volume em mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> utilizada na prova em branco e o volume da mesma solução utilizada para titular a amostra, M é a massa inicial de amostra em gramas e 6,25 é o fator empírico indicado pela metodologia para transformar g de nitrogênio em g de proteínas, considerando que o teor médio de nitrogênio em proteínas é de aproximadamente 16%.

#### 4.2.6 Granulometria e preparo da amostra.

Para determinação da granulometria do material foram utilizadas peneiras da série Tyler com aberturas 8, 12, 20, 24, 32 e 48 mesh (CZAIKOSKI, 2014).

Aproximadamente 50 g de amostra de microalga seca em estufa foram pesados e colocados sobre o conjunto de peneiras anteriormente citado, sendo que cada peneira havia sido previamente pesada. Este conjunto de peneiras contendo a amostra foi agitado com auxílio de um agitador mecânico (Bertel) por 5 min, com o reostato na posição 8. Após este período as peneiras contendo frações da amostra inicial foram pesadas para determinação da fração mássica retida, que foi calculada conforme a Equação 4,

$$\text{Fração retida (\% m/m)} = [(M_2 - M_1) / M_T] \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde  $M_2$  é a massa da peneira contendo a amostra após processo de agitação,  $M_1$  é a massa da peneira vazia e  $M_T$  é a massa total de amostra.

As determinações da granulometria do material foram realizadas em duplicata. Posteriormente, a totalidade da biomassa foi submetida ao peneiramento, sendo que a fração que não ficou retida em nenhuma das peneiras foi armazenada separadamente e as demais frações foram reunidas e homogeneizadas em uma única amostra, que foi armazenada em saco plástico e mantida congelada até o seu uso.

Com estes resultados e utilizando a Equação 5, foi possível calcular o diâmetro médio das partículas do leite (CORREA, 2016),

$$D_s = \sum X_i \times D_i \quad \text{Equação 5}$$

onde  $D_s$  é o diâmetro médio das partículas (em mm),  $X_i$  é a fração de massa retida na peneira e  $D_i$  é o diâmetro médio da peneira (em mm).

#### 4.2.7 Esterificação do material lipídico da microalga.

A microalga seca, os extratos oriundos dos processos de extração que serão descritos posteriormente e a microalga extraída (resíduos de extração) foram submetidos à metodologia de Hartman e Lago adaptada e descrita por Menezes *et al.* (2013) e utilizada por Batista (2016) e Silva (2013).

Inicialmente, foi preparada uma solução esterificante por dissolução de 2 g de cloreto de amônio em 60 mL de metanol, seguida da adição de 3 mL de ácido

sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Posteriormente, 100 mg da amostra foram transferidos para tubos de ensaio com tampa rosqueável, aos quais foram adicionados 1,5 mL de uma solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em metanol. Os tubos foram fechados e aquecidos a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  em banho-maria por 10 min. Após este período, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e 4,5 mL da solução esterificante preparada previamente foram adicionados a cada tubo. Novamente, os tubos foram aquecidos a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min e em seguida resfriados até temperatura ambiente para adição de 2,5 mL de heptano e (2,0-10,0 mL) de água destilada. Os tubos foram agitados e a separação de fases foi induzida por centrifugação em tubos de centrífuga de 15 mL por 5 min a 5000 rpm. Coletou-se 1 mL da fração heptânica sobrenadante e esta foi transferida para um Eppendorf previamente pesado, que foi mantido em estufa a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  até evaporação total do solvente. Posteriormente, o Eppendorf foi resfriado em dessecador e pesado. A amostra foi então solubilizada em 1 mL de heptano e submetida à análise cromatográfica, conforme os parâmetros apresentados no item 4.2.8.

Para a determinação do teor de ésteres na microalga seca em estufa utilizou-se a Equação 6,

$$T_{(\text{ésteres})} (\text{g}/100 \text{ g}) = [(M_{\text{final}} - M_{\text{inicial}}) \times 2,5] / M_{\text{amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

onde  $T_{(\text{ésteres})}$  é o teor de ésteres presentes nas amostras analisadas, podendo se referir aos extratos, resíduos de extração ou biomassa seca,  $M_{\text{final}}$  é a massa final de ésteres presente no Eppendorf após ser submetido à secagem em estufa (em g),  $M_{\text{inicial}}$  é a massa do Eppendorf vazio (g) e  $M_{\text{amostra}}$  é a massa de amostra submetida ao método de Hartman e Lago modificado.

#### 4.2.8 Análise cromatográfica para determinação do perfil de ésteres.

O perfil de ésteres dos extratos foi determinado após diluição apropriada das amostras para análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). As análises foram realizadas em GC-MS da Shimadzu® utilizando coluna capilar VF-5MS (30 m x 0,25 mm, com espessura de filme de 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás de arraste a uma vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . O volume de injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  sem qualquer divisão de amostra (modo *splitless*). A temperatura do injetor foi

ajustada em 280°C, a linha de transferência em 280 °C e a fonte de íon em 300 °C. A programação de temperatura para a coluna foi iniciada em 100 °C por 1 min, seguida de aquecimento a 10 °C min<sup>-1</sup> até atingir 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 2 min para depois ser novamente aquecida a 3,5 °C min<sup>-1</sup> até atingir 260 °C, onde permaneceu até o final da análise (total de 37 min). Os espectros foram coletados a cada 0,5 s na faixa de 32 a 380 m/z. A identificação de cada analito foi realizada por comparação dos tempos de retenção de padrões cromatográficos de ésteres metílicos na faixa de C4 a C24 (Supelco™ 37 Component FAME Mix) e pela avaliação dos seus respectivos espectros de massas, que foram comparados com os dados disponíveis na biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) do equipamento. O perfil lipídico foi determinado por normalização de área.

#### 4.2.9 Extração de óleo de microalga em sistema convencional.

A extração convencional foi realizada em sistema Soxhlet empregando os mesmos solventes testados por Baumgardt *et al.* (2016). Foram transferidos para um cartucho de papel cerca de 5 g de biomassa (seca em estufa) e esse foi inserido no interior do extrator. Em seguida, 200 mL de solvente foram adicionados ao balão previamente limpo e pesado. O balão foi conectado ao extrator que continha o extrato e o conjunto foi mantido em refluxo por 12 h. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada solvente: etanol, clorofórmio: metanol (2:1, v/v) e hexano. Transcorrido esse período, o solvente foi destilado em evaporados a baixa pressão. O extrato retido no balão foi seco em estufa a 60 °C para retirada de solvente residual, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. O rendimento percentual em base úmida foi calculado subtraindo-se a massa do balão da massa do balão após o processo de extração ( $M_{ext.}$ ), seguida da divisão pela massa da amostra de biomassa de microalga ( $M_{am.}$ ) seguindo a seguinte equação,

$$R_{convencional} (\%) = [M_{extrato} / M_{amostra}] \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

onde  $R_{convencional}$  é o rendimento mássico da extração convencional,  $M_{extrato}$  é a massa de extrato (em g) e a  $M_{amostra}$  é a massa de amostra inicial (g).

Amostras dos extratos oriundos de cada composição de solvente foram coletadas e analisadas conforme a metodologia indicada no item 4.2.7 e os parâmetros cromatográficos indicados no item 4.2.8. As amostras dos resíduos de extração também foram analisadas para se certificar se algum material lipídico residual permaneceu na biomassa após 12 h de extração.

O cálculo do teor de ésteres totais em relação à massa de biomassa utilizada na extração foi realizado segundo a seguinte equação,

$$T_{(\text{ésteres/biomassa})}(\text{g}/100\text{g}) = (T_{(\text{ésteres nos extratos})} \times M_{\text{extrato}}) / M_{\text{amostra}} \quad \text{Equação 8}$$

onde  $T_{(\text{ésteres/biomassa})}$  refere-se ao teor de ésteres em relação à biomassa utilizada nas extrações tanto convencional como em estado supercrítico,  $T_{(\text{ésteres nos extratos})}$  é o teor de ésteres totais presente no extrato,  $M_{\text{extrato}}$  é a massa de extrato gerado no processo de extração (g) e  $M_{\text{amostra}}$  é a massa de biomassa utilizada na extração.

#### 4.2.10 Densidade real e aparente das partículas da amostra.

A densidade real ( $d_r$ ) foi determinada utilizando a técnica de picnometria em gás hélio, realizada pelo Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP).

A densidade aparente ( $d_a$ ) foi calculada dividindo-se a massa de amostra utilizada para formar o leito de extração em Kg ( $M_{\text{am}}$ ) pelo volume do leito de extração em  $\text{m}^3$  ( $V_{\text{leito}}$ ) (CORREA, 2016; CZAİKOSKI, 2014).

#### 4.2.11 Porosidade do leito de extração.

A porosidade do leito de extração foi calculada conforme Equação 9 (CORREA, 2016; CZAİKOSKI, 2014),

$$\varepsilon = 1 - (d_a/d_r) \quad \text{Equação 9}$$

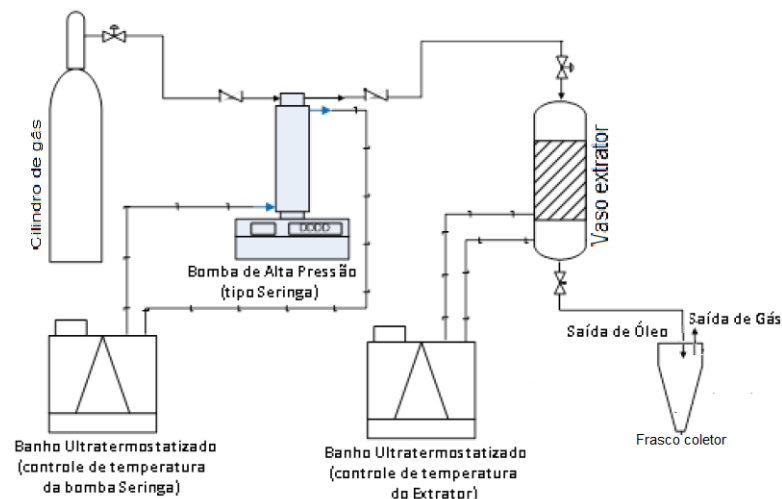
onde  $\varepsilon$  é a fração de volume intersticial ou porosidade do leito,  $d_a$  é a densidade aparente e  $d_r$  é a densidade real da amostra.

#### 4.2.12 Extração de óleo de microalga em sistema com fluido pressurizado.

Os experimentos de extração do óleo de microalga com fluido pressurizado foram realizados em extrator batelada, composto por um vaso de aço encamisado conectado a um banho ultratermostático para manter a temperatura constante durante os períodos de confinamento e extração. Além disso, esse vaso foi acoplado a uma bomba seringa de alta pressão (TELEDYNE ISCO 500D), que permite a compressão do gás e sua injeção na célula extratora. A bomba foi mantida a 10 °C durante todos os experimentos, assim como a vazão de gás (2 mL min<sup>-1</sup>). O esquema que representa o sistema de extração encontra-se na FIGURA 11.

Para as extrações sem adição de cossolvente, 22 g de amostra foram pesadas em um béquer e a massa foi então transferida para o extrator, enquanto que para as extrações com cossolvente, 22 g de etanol foram adicionados com auxílio de uma proveta à mesma massa de microalga e, posteriormente, esta mistura foi homogeneizada com auxílio de uma espátula e transferida para o vaso extrator. O sistema foi condicionado na temperatura definida nos planejamentos experimentais e esta foi mantida com auxílio de um banho circulante ultratermostatizado (Quimis).

FIGURA 11 - ESQUEMA DE APARATO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÕES COM FLUIDO PRESSURIZADO



FONTE: (MESOMO, 2013)

Após vedação do vaso de extração, o gás foi pressurizado em condições pré-definidas no planejamento proposto para depois ser injetado na célula extratora com auxílio de válvulas. A amostra foi mantida confinada nestas pressões por 90 min.

Após esse período, deu-se início à extração coletando-se, em frascos âmbar previamente pesados, alíquotas de extrato a cada 10 min por um tempo total de 120 min. No caso das extrações sem cossolvente, a coleta de extrato ocorreu a cada 2 min até não se perceber a presença de extrato nos tubos de ensaio previamente pesados. O rendimento da extração foi determinado gravimetricamente conforme Equação 10,

$$R_{\text{fluido pressurizado}} (\%) = [M_{\text{extrato}}/M_{\text{amostra}}] \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

onde  $R_{\text{fluido pressurizado}}$  é o rendimento mássico da extração com propano e  $\text{CO}_2$  pressurizados,  $M_{\text{extrato}}$  é a massa de extrato coletada no frasco a cada intervalo de tempo, que foi obtida pela diferença de massa do frasco vazio e do frasco contendo o extrato, e  $M_{\text{amostra}}$  é a massa de biomassa utilizada na extração. Entretanto, para as extrações com cossolvente, a massa de extrato foi determinada após a evaporação total do solvente em estufa a  $60^\circ\text{C}$ .

Os experimentos seguiram os planejamentos fatoriais  $2^2$  apresentados nas TABELAS 6 e 7, analisando-se a influência das variáveis pressão e temperatura em três diferentes níveis: superior (+1), inferior (-1) e central (0), sendo que o experimento referente ao ponto central foi realizado em duplicata para o gás dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em estado supercrítico, propano pressurizado e para as extrações utilizando esses mesmos gases na presença de etanol ou hexano como cossolventes. Os extratos e a biomassa extraída foram armazenados em congelador ( $-6^\circ\text{C}$ ) ao abrigo de luz até serem analisados pelas metodologias indicadas nos itens 4.2.7 e 4.2.8

TABELA 6 - PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^2$  PARA EXTRAÇÕES COM  $\text{sc-CO}_2$  COM E SEM ADIÇÃO DE ETANOL COMO COSSOLVENTE

Experimento	Pressão (bar) *	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )
1	150 (-1)	40 (-1)
2	250 (1)	40 (-1)
3	150 (-1)	80 (1)
4	250 (1)	80 (1)
5	200 (0)	60 (0)
6	200 (0)	60 (0)

LEGENDA: \* Os valores entre parêntesis representam os níveis codificados do planejamento.

Para se avaliar a influência do hexano sobre o rendimento das extrações, esse foi utilizado em combinação com os gases propano e CO<sub>2</sub> nas condições do ponto central de cada um dos dois planejamentos, que correspondem às condições codificadas como (0) nas TABELAS 6 e 7 seguindo a mesma metodologia utilizada para as extrações com etanol.

TABELA 7- PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>2</sup> PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO PRESSURIZADO COM E SEM ADIÇÃO DE ETANOL COMO COSSOLVENTE

Experimento	Pressão (bar) *	Temperatura (°C)
1	50 (-1)	40 (-1)
2	100 (1)	40 (-1)
3	50 (-1)	80 (1)
4	100 (1)	80 (1)
5	75 (0)	60 (0)
6	75 (0)	60 (0)

LEGENDA: \* Os valores entre parêntesis representam os níveis codificados do planejamento.

#### 4.2.13 Avaliação dos resultados.

Para avaliação dos resultados obtidos foi verificada a influência dos fatores pressão e temperatura sobre o rendimento da extração com auxílio do programa STATISTICA 8.0, que permitiu a obtenção do diagrama de Pareto e a realização da análise de variância (ANOVA). O programa Excel 2007 foi utilizado para a obtenção das curvas cinéticas, cálculos referentes às análises químicas e de rendimento de extração.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo são apresentados os resultados obtidos para caracterização da matéria-prima, objeto de estudo deste trabalho, estabelecendo comparação de parâmetros como cinzas e proteínas com dados relatados para outras espécies de microalgas. Constam ainda nesse capítulo os dados de rendimento mássico para os processos de extração convencional e com fluido pressurizado, associado ou não a cossolventes, além da avaliação do potencial de conversão em ésteres metílicos e do perfil de ácidos graxos desses diferentes extratos.

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

#### 5.1.1. Determinação de umidade.

Amostras *in natura* e secas em estufa foram submetidas à análise de umidade conforme a metodologia descrita no item 4.2.3 e os resultados obtidos estão descritos na TABELA 8.

TABELA 8 - ANÁLISE DE UMIDADE DA MATÉRIA- PRIMA

Amostra	Umidade (%)
<i>In natura</i>	81,09±0,42
Estufa	9,17 ± 0,42

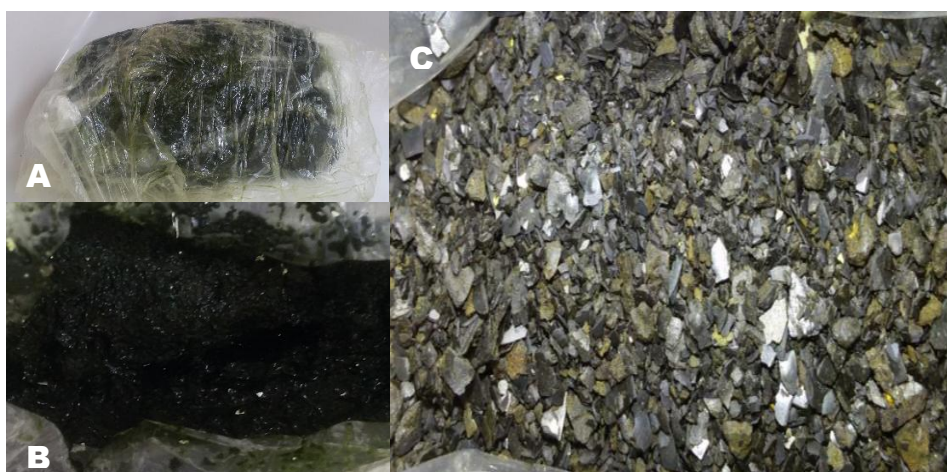
O processo de secagem permitiu a redução de cerca de 70% da umidade do material de partida, o que alterou o aspecto da matéria-prima, que descongelada se assemelhava a uma “lama” e após a secagem e trituração tornou-se um pó (FIGURA 11). Este processo facilitou a manipulação e homogeneização deste material para as análises realizadas posteriormente. As demais análises como cinzas, proteínas e granulometria, foram realizadas apenas com o material seco em estufa.

#### 5.1.2. Análise de cinzas e proteína.

Os teores de cinzas e de proteínas, calculados em base seca e base úmida, estão apresentados na TABELA 9. Esses dois parâmetros são medidas importantes para a caracterização da matéria-prima. O teor de proteínas permite avaliar o potencial nutricional da biomassa a ser empregada nos processos de extração. Um material com elevado teor de proteínas, após ser submetido ao processo de

extração de seu teor lipídico, pode ser utilizado para outros fins como, por exemplo, na formulação de ração animal. Quanto ao teor de cinzas, este também tem relevância para esta mesma aplicação e sua presença em excesso pode comprometer a qualidade dos extratos obtidos. Algumas normas de qualidade associadas à produção e uso do biodiesel (ANP 7/2008, EN14214 e ASTM D6751) estabelecem limites para cinzas sulfatadas e outros parâmetros inorgânicos, como sódio, potássio, fósforo, cálcio e magnésio (CARVALHO JUNIOR, 2010). Além disso, é importante comparar os resultados obtidos com outros relatados para essa e outras microalgas consideradas adequadas para a síntese de biodiesel.

FIGURA 12– ASPECTO DA MICROALGA *Choricystis minor* var. *minor*



LEGENDA: A -microalga *in natura* em tabletes; B – microalga descongelada; C – microalga seca em estufa e triturada.

TABELA 9 - DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CINZAS E PROTEÍNAS DA MICROALGA *Choricystis minor* var. *minor*

Parâmetro	Base úmida (%)	Base seca (%)
Cinzas (%)	6,67 ± 0,11	7,35 ± 0,12
Proteínas (%)	42,38 ± 0,22	46,49 ± 0,25

Os teores de proteínas e cinzas variam bastante em microalgas de acordo com a espécie e condições empregadas no cultivo (SANTOS *et al.*, 2003). Liu *et al.* (2015) demonstram que ao aumentar a disponibilidade de nitrogênio para as microalgas marinhas *Isochrysis zhangjiangensis*, *Tetraselmis subcordiformis* e *Nannochloropsis oceanica* o teor proteico destas se tornam maiores se comparados a condições com menor disponibilidade de nitrogênio. Para estas espécies de

microalgas o teor proteico mais elevado alcançou valores próximos a 30%. Quando se reduziu a quantidade de nitrogênio disponível no meio de cultivo a quantidade de proteínas geradas pelas microalgas *Isochrysis zhangjiangensis* e *Tetraselmis subcordiformis* foi cerca de 8% e para a microalga *Nannochloropsis oceanica* o valor obtido foi de 24%.

Dados apresentados por Dermibas *et al.* (2011) revelam a grande variação no conteúdo proteico de diferentes espécies de microalgas, a espécie dulcícola *Chlorella pyrenoidosa* pode ser constituída por até 57% de proteínas, enquanto que a espécie *Spirulina maxima* pode alcançar até 71%. Ainda existem gêneros com teor de proteínas menos elevados como a microalga verde *Spirogyra sp.*, cujo teor proteico pode variar de 6 a 20%. Entre as microalgas citadas a *Choricystis minor var. minor* apresentou teor de proteínas mais semelhante a microalga *Chlorella pyrenoidosa*. O teor de cinzas está relacionado ao conteúdo mineral presente na biomassa. Renaudl *et al.* (1994) apresentaram dados a respeito da composição química das microalgas verdes e dulcícolas *Scenedesmus dimorphus*, *Ankistrodesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.* Estas apresentaram teor de cinzas de 2,4%, 4,6% e 2,1%, respectivamente. Brandalize (2014) também determinou o teor de cinzas para microalga *Chlorella pyrenoidosa* e neste trabalho o teor médio de cinzas correspondeu a 6,63%. Entre as microalgas citadas a *Chlorella pyrenoidosa* foi a que apresentou teor de cinzas mais próximo ao da *Choricystis minor var. minor*.

### 5.1.3. Granulometria.

A fração retida nas peneiras com aberturas de 8, 12, 20, 24, 32 e 48 mesh foi de respectivamente  $6,92 \pm 0,48\%$ ,  $20,06 \pm 0,23\%$ ,  $20,96 \pm 0,31\%$ ,  $12,21 \pm 0,22\%$ ,  $12,51 \pm 0,26\%$  e  $15,04 \pm 0,34\%$ . O material não retido correspondeu a  $12,29 \pm 0,10\%$  do total da massa empregada no teste, sendo que este material não foi utilizado nas extrações. Com estes resultados e utilizando a Equação 4 foi determinado o diâmetro médio das partículas, que correspondeu a 0,816 mm.

A determinação do tamanho médio das partículas que compõem a matriz, portanto do leite de extração, tem relevância nos processos extrativos. Partículas menores permitem uma extração mais eficiente como verificado por Massarolo *et al.* (2017). Esses autores verificaram que amostras de farelo de arroz, com diâmetro médio menor que 0,39 mm, apresentaram maior rendimento de compostos bioativos,

se comparados a processos extrativos empregando partículas com diâmetros maiores. Isto se deve ao fato de que partículas menores apresentam áreas superficiais maiores permitindo uma maior acessibilidade ao solvente (DUBA *et al.*, 2015; MASSAROLO *et al.*, 2017), entretanto existe um limite para que esta diminuição das partículas afete de modo positivo a extração, se as partículas forem muito pequenas ocorre a formação de agregados (*clusters*) o que impede a passagem do fluido supercrítico pelo leito prejudicando o rendimento da extração (MASSAROLO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2015).

#### 5.1.4. Densidade real, aparente e porosidade.

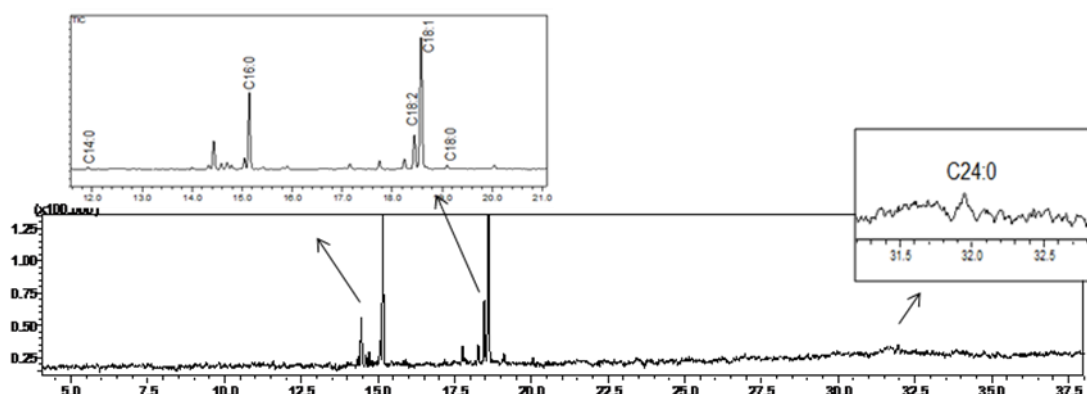
A densidade real obtida experimentalmente para esta matriz foi de  $1.280 \pm 0,01 \text{ Kg m}^{-3}$ , enquanto que a densidade aparente, calculada conforme descrito no item 4.2.10, correspondeu a  $735,17 \text{ Kg m}^{-3}$ . Já o valor determinado para fração de volume intersticial do leito ou porosidade foi de 0,57. Estes parâmetros são relevantes por caracterizarem o leito de extração.

A porosidade ou fração de vazios está relacionada com a velocidade com que o fluido passa pelo leito, assim como a capacidade de interação entre o fluido e a matriz; além disso, essa medida é útil para modelagens matemáticas que permitam o desenvolvimento de unidades de extração de alta eficiência (CREMASCO, 2012). Dados de Duba *et al.* (2015) para extrações de sementes de uvas com  $\text{sc-CO}_2$ , indicaram que a redução na porosidade do leito de extração tem relação direta com a diminuição do tempo de residência do fluido no leito, acarretando em menores rendimentos de extração. Esses autores indicaram que valores de porosidade do leito de 0,1 apresentaram rendimentos piores se comparados a extrações realizadas em porosidades na faixa de 0,23 a 0,41. O valor de porosidade de leito obtido para a biomassa de *Choricystis minor var. minor* foi superior aos investigados por Duba *et al.* (2015) e igualmente superior ao observado por Mouahid *et al.* (2016) para a microalga *Dunaliella salina*, que apresentou porosidade de 0,35. Assim, porosidades de 0,57 sugerem que a biomassa de *Choricystis minor var. minor* apresentará boa permeabilidade e, por conseguinte, bons rendimentos de extração de seu material lipídico.

## 5.2. TEOR DE ÉSTERES E PERFIL CROMATOGRÁFICO DA BIOMASSA SECA EM ESTUFA

Amostras da biomassa seca em estufa foram submetidas à metodologia descrita no item 4.2.7 e 4.2.8 para avaliação do teor de ésteres passíveis de serem obtidos a partir desta matriz, assim como o perfil de ácidos graxos que a caracteriza. Para a biomassa seca, o valor médio para medidas em triplicata do teor de ésteres totais foi de  $23,2 \pm 1,9$  g/100g. Já o cromatograma com os picos referentes aos principais ácidos graxos, identificados na microalga *Choricystis minor* var. *minor* como ésteres metílicos, encontra-se apresentado na FIGURA 13.

FIGURA 13 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *Choricystis minor* var. *minor* SECA EM ESTUFA ANALISADO POR CROMATOGRAFIA A GÁS NA FORMA DE ÉSTERES METÍLICOS



Por meio de comparação com padrões verdadeiros de ésteres metílicos e avaliando-se o índice de similaridade com a biblioteca NIST, os seguintes ácidos graxos foram identificados como majoritários na biomassa de *Choricystis minor* var. *minor*: palmítico (C16:0), linoleico (C18:2 Z9 Z12) e oleico (C18:1 Z9). Além desses, também foi constatada a presença dos ácidos palmitoleico (C16:1 Z9) e lignocérico (C24:0). Outros ácidos graxos puderam ser identificados na forma de ésteres metílicos apenas com auxílio da biblioteca NIST e entre esses o que apresentou maior proporção foi o ácido hexadecatetraenoico (C16:4 4,7,10,13), além de outros componentes minoritários. Os tempos de retenção, índices de similaridade com a biblioteca NIST e a proporção relativa destes ácidos graxos (na forma de ésteres metílicos) e de outros componentes da amostra são apresentados na TABELA 10. A identificação de alguns compostos não foi possível devido à baixa similaridade com as estruturas propostas da biblioteca NIST. Entretanto, é válido destacar que

nenhuma destas estruturas se referia a ésteres graxos e esses representaram um total de 9,13% da área total do cromatograma.

TABELA 10 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *Choricystis minor var. minor*, CARACTERIZADOS POR CROMATOGRAFIA NA FORMA MONOÉSTERES METÍLICOS

Ácidos graxos	C <sub>n</sub> :M <sup>a</sup>	Índice NIST (%)	t <sub>R</sub> <sup>b</sup>	% Área
Tetradecanoico (Mirístico)	C14:0	98	11,91	0,54
NI <sup>c</sup>			13,58	0,16
NI			13,99	0,47
4,7,10-Hexadecatrienoico	C16:3 (Z4, Z7, Z10)	90	14,33	1,10
4,7,10,13-Hexadecatetranoico	C16:4 (Z4, Z7, Z10, Z13)	91	14,43	7,64
7,10-Hexadecadienoico	C16:2 (Z7, Z10)	92	14,58	1,38
7-Hexadecenoico	C16:1 (Z7)	85	14,69	2,13
9-Hexadecenoico (Palmitoleico)	C16:1 (Z9)	94	14,79	0,89
6-Hexadecenoico	C16:1 (Z6)	91	15,05	2,71
Hexadecanoico (Palmítico)	C16:0	98	15,14	20,37
NI			15,42	0,54
NI			15,90	0,76
NI			17,15	1,54
NI			17,74	2,31
6,9,12,15-Octadecatetraenoico	C18:4 (Z6, Z9, Z12, Z15)	96	18,24	3,00
9,12-Octadecadienoico (Linoleico)	C18:2 (Z9, Z12)	98	18,45	10,26
9-Octadecenoico (Oleico)	C18:1 (Z9)	88	18,58	40,41
Octadecanoico (Estearico)	C18:0	97	19,10	0,83
NI			20,04	1,03
Tetracosanoico (Lignocérico)	C24:0	94	31,90	1,39
Saturados	--	--	--	23,14
Insaturados	--	--	--	69,52
Monoinsaturados	--	--	--	46,14
Di-insaturados	--	--	--	11,64
Tri-insaturados	--	--	--	1,10
Poli-insaturados	--	--	--	10,65

LEGENDA:(a) Número de carbonos da cadeia alquílica dos ácidos graxo sem relação ao número de ligações duplas; (b) Tempo de retenção em minutos; (c) NI não identificado.

O perfil lipídico apresentado na TABELA 10 é semelhante ao obtido por Menezes *et al.* (2016) para essa mesma espécie de microalga, empregando cultivos também baseados no meio BBM. Esses autores identificaram os seguintes ácidos graxos majoritários na biomassa da microalga, na forma de ésteres metílicos, após tê-la submetido à metodologia de Hartman e Lago: oleico (39,2%), palmítico (23,43%), linoleico (9,6%), linolênico (5,42%) e hexadecatrienoico (4,76%), totalizando cerca de 82% da constituição lipídica da microalga. O restante seria composto por ácidos graxos minoritários, dentre os quais os ácidos esteárico (2,46%) e mirístico (0,62%), entre outros.

Embora o ácido hexadecatrienoico não tenha sido identificado por Menezes *et al.* (2016) em seus estudos com *C. minor* var. *minor*, este composto faz parte do perfil lipídico de outras microalgas. Islam *et al.* (2013) identificaram este ácido graxo como parte do perfil das microalgas *Scenedesmus dimorphus* (15,6%), *Franceia* sp. (17%) e *Mesotaenium* sp. (16,4%) em proporções elevadas se comparadas ao descrito na TABELA 10 para *Choricystis minor* var. *minor*. Esses dados também indicam a presença de uma maior proporção de compostos insaturados (69,52%) em relação a compostos saturados (23,14%), resultados também semelhantes ao obtido por Menezes *et al.* (2016), que obtiveram valores de 70,8% e 28,76%, respectivamente.

A proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados presentes na matéria-prima tem grande relevância para o processo de obtenção de biodiesel, pois se esta apresentar elevadas quantidades de compostos insaturados pode tornar o produto mais suscetível à degradação por processos oxidativos. Todavia, a presença de grandes proporções de compostos saturados leva ao aumento no ponto de fusão do combustível, podendo comprometer as suas propriedades de fluxo a frio e causar entupimento de válvulas e injetores ao ser utilizado em temperaturas mais baixas (LOBO *et al.*, 2009). Embora a microalga *Choricystis minor* var. *minor* apresente um teor elevado de compostos insaturados, o ácido linolênico está presente em quantidade inferior ao estabelecido na norma EN14214, que define um limite máximo de 12% para este componente devido a sua baixa estabilidade à oxidação (MENEZES *et al.*, 2016). Contudo, seria necessário avaliar outros parâmetros para se determinar a viabilidade do uso desta microalga para síntese de

biodiesel, ou a necessidade de utilização de aditivos químicos para correção de possíveis desconformidades em relação aos padrões internacionais de qualidade.

### 5.3.RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL

O rendimento da extração convencional foi calculado conforme Equação 7 e os teores de ésteres nos extratos, na biomassa extraída (resíduo de extração) e na biomassa seca em estufa foram calculados utilizando a Equação 6. Os resultados obtidos para os extratos e resíduos estão apresentados na TABELA 11.

TABELA 11- RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Choricystis minor* var. *minor* EM SISTEMA CONVENCIONAL COM DIFERENTES SOLVENTES

Solvente	Hexano	Clorofórmio: Metanol (2:1 v/v)	Etanol
Rendimento da extração (%)	10,6 ± 0,7	30,9 ± 2,0	30,5 ± 1,9
Teor de ésteres nos extratos (g/100g)	84,1 ± 6,3	34,1 ± 6,8	33,5 ± 11,9
Teor de ésteres (g/100g de biomassa) (A)	8,5 ± 0,6	8,9 ± 0,6	10,2 ± 3,9
Teor de ésteres no resíduo (g/100g) (B)	9,7 ± 1,9	6,9 ± 0,5	7,6 ± 0,1
A + B	18,2	15,8	17,8

Em relação ao rendimento mássico das extrações com cada solvente envolvido nesse estudo pode ser observado que o hexano se mostrou menos eficiente quando comparado ao etanol e à mistura clorofórmio: metanol. Essa diferença nos rendimentos de extração se deve à diferença de polaridade entre os solventes utilizados. O hexano é um solvente apolar, capaz de promover a extração de lipídios neutros presentes na parede celular das algas e no citoplasma. Lipídios polares como fosfolipídios, lipídios associados às proteínas da membrana celular e outros lipídios complexos (esteroides, esteroides glicosilados), pigmentos (clorofila, fucoxantinas) são mais facilmente extraídos por solventes polares como metanol e etanol devido à capacidade desses solventes em interagir por ligações de hidrogênio (HALIM *et al.*, 2012). De forma, solventes polares são capazes de extrair uma gama

maior de componentes da biomassa, devido a capacidade de solubilizar substâncias em um range maior de polaridade.

Brandalize (2014), Batista (2016) e Baumgardt *et al.* (2016) obtiveram rendimentos mássicos de extrato hexânico de 1,7%, 2,7% e 4,8%, empregando sistema Soxhlet por 12 h de extração (TABELA 3). Os dois primeiros estudos foram realizados com a *Chlorella pyrenoidosa* enquanto o último foi desenvolvido com *Nannochloropsis oculata*. Dessa forma, a partir dos resultados apresentados na Tabela 11 observa-se que os rendimentos de extrato hexânico de *Choricystis minor* var. *minor* foram superiores, indicando a presença de uma maior quantidade de lipídios neutros nessa matriz.

SOBCZUK *et al.* (2010) utilizaram uma mistura 1:2:0,8 (v/v/v) de clorofórmio, metanol e água para a extração de lipídios de *Choricystis minor* e obtiveram rendimento mássico médio de 23,9 g de óleo para 100 g de biomassa seca, valor próximo ao obtido nesse trabalho ao se empregar a mistura clorofórmio:metanol (30,9 g 100 g<sup>-1</sup>) e o etanol (30,5 g 100 g<sup>-1</sup>) como solvente.

Após ser submetido à metodologia de Hartman e Lago, o extrato hexânico, apresentou teor de ésteres de 84,1%, valor este superior ao obtido com etanol (33,5%) e com a mistura clorofórmio:etanol (30,9%). Um comportamento semelhante foi verificado por Baumgardt *et al.* (2016) ao avaliarem o teor de ésteres em extratos oriundos da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*. Esses autores relataram que o teor de ésteres no extrato hexânico foi cerca de 54%, enquanto que para os extratos oriundos da mistura clorofórmio:metanol e do etanol os resultados obtidos foram de 15,4% e 23,6%, respectivamente. O teor de ésteres nos extratos hexânicos é maior do que o dos demais extratos devido à maior seletividade do hexano a acilglicerois, ácidos graxos e hidrocarbonetos (VIEGAS, 2010). Como dito anteriormente, acilglicerois e ácidos graxos podem ser transformados em ésteres metílicos (biodiesel) empregando reações sequenciais de saponificação e esterificação (princípios do método de Hartman e Lago), o que permite avaliar o potencial do óleo de microalga para síntese de biodiesel.

Conforme verificado na TABELA 11, o etanol apresentou rendimento de extração e teor de ésteres totais no extrato semelhantes aos resultados alcançados pela a mistura clorofórmio: metanol, com a vantagem deste solvente ser menos tóxico e oriundo de fonte renovável (BAUMGARDT, 2013). Em plantas industriais é

possível planejar processos extrativos de óleo de microalga utilizando etanol como solvente seguido de processos de reação para obtenção de biodiesel etílico sem a necessidade da destilação do solvente antes da etapa de reação.

O teor de ésteres calculado em relação à biomassa empregada na extração não demonstrou diferença significativa entre os três solventes empregados. Portanto, após 12 h de extração, os solventes apresentaram a mesma capacidade de extrair materiais lipídicos passíveis de serem convertidos em ésteres.

Amostras em duplicata dos extratos obtidos nas extrações convencionais foram submetidas às metodologias descritas nos itens 4.2.7 e 4.2.8 para obtenção de seus respectivos perfis de ácidos graxos. Tais resultados encontram-se registrados na TABELA 12. Tais resultados demonstram que os produtos das três extrações não apresentaram diferenças significativas quanto à composição química. Portanto, a mesma proporção de ácidos graxos saturados e insaturados foi observada em todos os extratos, em comparação com o que fora verificado para a microalga seca em estufa. Nota-se uma vez mais que os ácidos graxos insaturados contêm majoritariamente apenas uma única ligação dupla e que não foram encontrados ácidos graxos com mais de quatro insaturações na cadeia em quantidades superiores a 1%. Tal resultado, para os três extratos, estaria de acordo com a norma EN14214 que estabelece um limite máximo de 1% para esse tipo de componente no biodiesel (CARVALHO JÚNIOR, 2010).

Baumgardt *et al.* (2016), ao testarem os mesmos sistemas de solvente para extração dos lipídios da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, também não observaram diferenças expressivas na análise composicional dos extratos. Da mesma forma, D'Oca *et al.* (2011) chegaram à mesma conclusão ao extraírem biomassa da microalga dulcícola *Chorella pyrenoidosa* com os mesmos solventes, empregando métodos de extração baseados em agitação magnética e exposição à irradiação ultrassônica.

O único ácido graxo que apresentou teores distintos em cada sistema de solvente testado foi o ácido palmítico que foi determinado em maiores teores (22,63 e 22,81%) nos extratos obtidos em etanol e clorofórmio: metanol, respectivamente. Já o extrato hexânico foi o que apresentou menor teor deste ácido graxo (16, 58%). Os cromatogramas referentes a cada extrato são apresentados no APENDICE 1, (A.1-1, A.1-2, A.1-3).

TABELA 12 -PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS *Choricystis minor*. var *minor* OBTIDOS EM SISTEMA SOXHLET

Ácidos graxos	C <sub>n</sub> :M <sup>a</sup>	% Área			Índice NIST (%)
		CHCl <sub>3</sub> :Metanol	Hexano	Etanol	
Tetradecanoico (Mirístico)	C14:0	0,73 ± 0,13	0,62 ± 0,0	0,71 ± 0,27	98
Pentadecanoico	C15:0	0,29 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,46 ± 0,31	94
4,7,10-Hexadecatrienoico	C16:3 (Z4, Z7, Z10)	1,57 ± 0,15	1,85 ± 0,06	1,47 ± 0,22	90
4,7,10,13-Hexadecatetraenoico	C16:4 (Z4, Z7, Z10, Z13)	5,83 ± 1,04	6,06 ± 0,06	5,02 ± 0,01	91
7,10-Hexadecadienoico	C16:2 (Z7, Z10)	1,68 ± 0,12	1,58 ± 0,00	1,70 ± 0,04	92
7-Hexadecenoico	C16:1 (Z7)	2,54 ± 0,00	2,83 ± 0,42	2,56 ± 0,28	85
9-Hexadecenoico (Palmitoleico)	C16:1 (Z9)	1,25 ± 0,00	1,11 ± 0,24	1,54 ± 0,26	94
6-Hexadecenoico	C16:1 (Z6)	2,95 ± 0,25	3,19 ± 0,21	2,86 ± 0,16	91
Hexadecanoico (Palmítico)	C16:0	22,63 ± 0,05	16,58 ± 0,01	22,81 ± 1,62	98
6,9,12,15-Octadecatetraenoico	C18:4 (Z6, Z9, Z12, Z15)	2,12 ± 0,19	2,42 ± 0,20	1,93 ± 0,04	96
9,12-Octadecadienoico (Linoleico)	C18:2 (Z9, Z12)	9,20 ± 0,30	9,86 ± 0,14	9,40 ± 0,13	98
9-Octadecenoico (Oleico)	C18:1 (Z9)	38,98 ± 0,81	42,44 ± 1,38	38,32 ± 0,08	88
Octadecanoico (Esteárico)	C18:0	0,89 ± 0,07	1,02 ± 0,10	1,07 ± 0,07	97
Tetracosanoico (Lignocérico)	C24:0	0,45 ± 0,55	0,87 ± 0,16	0,70 ± 0,07	94
Saturados	-	24,54	18,51	25,05	-
Insaturados	-	66,11	68,16	65,42	-
Monoinsaturados	-	45,72	49,58	45,29	-
Di-insaturados	-	10,88	11,44	11,11	-
Tri-insaturado	-	1,57	1,85	1,47	-
Poli-insaturado	-	7,95	8,48	6,95	-

LEGENDA: <sup>a</sup> Número de carbonos da cadeia alquílica dos ácidos graxos em relação ao número de ligações duplas.

## 5.4. CINÉTICA E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO (sc-CO<sub>2</sub>)

### 5.4.1. Rendimento e cinética de extração utilizando apenas sc-CO<sub>2</sub>

Na TABELA 13 estão apresentados os resultados das extrações com sc-CO<sub>2</sub>, em termos do rendimento da extração num tempo fixo de 120 min e diferentes condições de temperatura, pressão e densidade do sc-CO<sub>2</sub>.

TABELA 13 - RENDIMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA AS EXTRAÇÕES COM SC-CO<sub>2</sub>.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento mássico da extração (%)	Densidade do CO <sub>2</sub> (g mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
150	40°C	2,45	0,780
150	80°C	1,10	0,427
250	40°C	2,91	0,880
250	80°C	6,66	0,686
200	60°C	4,45 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,724

LEGENDA: <sup>a</sup> Dados de Linstrom; Mallard (2012); <sup>b</sup>Média e desvio da duplicata do ponto central do planejamento.

Na TABELA 13 observa-se que o menor rendimento foi obtido a 80 °C e 150 bar. Nesta condição, a densidade do CO<sub>2</sub> está abaixo da densidade crítica (0,468 g mL<sup>-1</sup>), o que resulta em uma menor solubilidade do extrato no solvente e menor taxa de transferência de massa (CZAIKOSKI *et al.*, 2015). Com um aumento de 100 bar, a esta mesma temperatura (80 °C), o rendimento de extração aumentou aproximadamente 6 vezes. Essa mudança na condição de operação ocasionou o aumento na densidade do CO<sub>2</sub> e conseqüentemente o aumento da capacidade de extração (BUNNER, 1994 *apud* LIVIA, 2013; DUBA *et al.*, 2015).

Considerando as extrações com sc-CO<sub>2</sub> observa-se que maior rendimento de extração se deu na mesma condição otimizada por Baumgardt *et al.* (2016) (80°C, 250 bar). Entretanto, o rendimento de extração obtido com a microalga *Choricystis minor* var. *minor* (6,66%) foi aproximadamente 6 vezes maior do que o obtido para a microalga *Nannochloropsis oculata* (BAUMGARDT *et al.*, 2016).

Quando comparados os resultados obtidos a 40 °C verifica-se que o aumento de pressão não acarretou mudanças significativas no rendimento da extração e isto se deve às pequenas variações na densidade do sc-CO<sub>2</sub> para esta condição de temperatura fixada e para duas pressões testadas (150 e 250 bar). Segundo Livia (2013), a capacidade de extração do solvente está relacionada com a sua densidade; portanto, diferenças pouco significativas na densidade do solvente levam a rendimentos muito semelhantes.

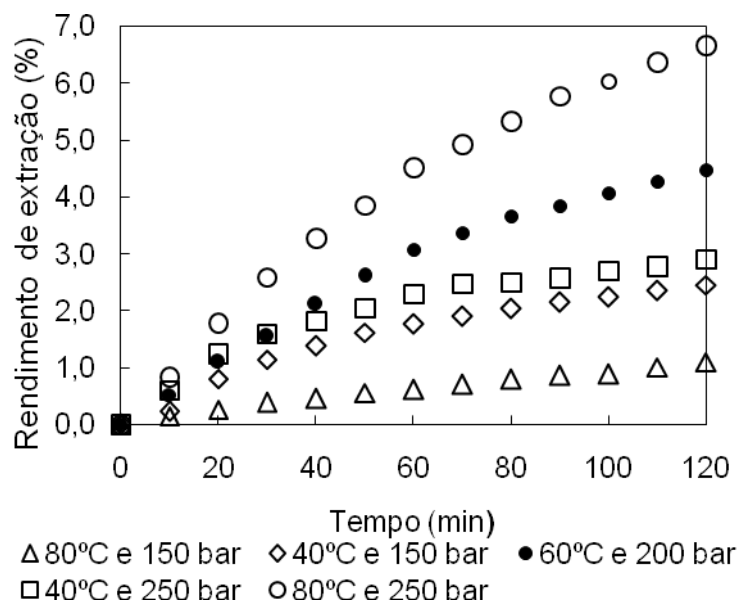
A partir dos resultados da TABELA 13 é possível ainda observar que na extração a 150 bar, houve diminuição no rendimento com o aumento da temperatura do sistema. Novamente, este fato pode ser atribuído a variação de densidade (a pressão constante), a qual diminuiu com o aumento da temperatura. Contudo, ao aumentar a temperatura na pressão de 250 bar, o rendimento da extração sofreu uma elevação mesmo com a redução na densidade do solvente. Tal fenômeno pode ser atribuído aos efeitos antagônicos que a temperatura causa sobre a solubilidade do soluto no fluido supercrítico. Inicialmente, em condições isobáricas, o aumento da temperatura reduz a densidade do fluido, reduzindo assim o seu poder de solvência. Por outro lado, o aumento da temperatura causa acréscimo na pressão vapor de compostos voláteis, tornando-os mais solúveis e aumentando assim o rendimento de extração (LIVIA, 2013; CZAIKOSKI *et al.*, 2015; DUBA *et al.*, 2015). Ressalte-se ainda que outras propriedades de transporte são diretamente afetadas pelo aumento da temperatura como, por exemplo, a viscosidade e a difusividade mássica do solvente supercrítico, as quais são diminuídas e aumentadas significativamente em condições isobáricas, respectivamente. Portanto, o efeito da temperatura no rendimento da extração depende essencialmente das condições isobáricas utilizadas. No caso em estudo, empregando a pressão de 250 bar, a temperatura apresentou maior influência sobre a solubilidade dos compostos do que sobre a densidade do fluido supercrítico.

As curvas que representam as cinéticas de extração em cada uma das condições testadas, incluindo a média da duplicata do ponto central do planejamento (60°C e 200 bar) são apresentadas na FIGURA 14.

A partir dos resultados apresentados na FIGURA 14, observa-se que a extração nas condições de 80 °C/250 bar e 60 °C/200 bar ocorrem a uma maior taxa do que nas demais condições. Avaliando-se o aspecto das curvas, percebe-se

também que apenas as extrações realizadas nessas condições apresentaram um comportamento que indica o início da segunda etapa da extração, pois os gráficos não se assemelham a uma reta (FERREIRA *et al.*, 2002; CORREA, 2016; LIVIA, 2013), ou seja, há uma curvatura devido ao decréscimo na taxa de extração (etapa FER) que é causado pela menor disponibilidade de extrato facilmente acessível ao solvente. Por outro lado, a condição de maior temperatura (80 °C) e menor pressão (150 bar) apresentou uma cinética de extração semelhante a uma reta, indicando que mesmo após 120 min, a extração continua na primeira etapa onde taxa de extração é constante (CER). Portanto, as partículas do leito ainda apresentam uma fina camada de extrato em sua superfície, sendo necessário mais tempo para que a extração alcance a segunda ou a terceira fase, onde a taxa de extração decai significativamente devido a preponderância do fenômeno de difusão.

FIGURA 14– CURVAS REPRESENTANDO A CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Choricystis minor var. minor* UTILIZANDO SC-CO<sub>2</sub>.



LEGENDA: Símbolo preenchido refere-se à média de uma duplicata

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de extração com sc-CO<sub>2</sub> (TABELA 13) apresentaram baixo coeficiente de determinação (0,903), além disso o valor obtido para o R explicado que indica a máxima variância explicada pelo modelo também foi insatisfatório (0,757). A falta de adequação do modelo também fica evidenciada pelo baixo valor de F (teste de Fisher) da regressão a um nível de 95% de confiança, sendo F calculado menor que o F tabelado (SANTOS *et al.*, 2015)

apresentados na TABELA 14. Esta falta de adequação pode ser atribuída ao comportamento anômalo da temperatura, que promove mudanças na densidade do gás pressurizado e na solubilidade dos compostos de maneira antagônica (CZAIKOSKI, 2014).

TABELA 14 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM SC-CO<sub>2</sub>.

Fator	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	F <sup>d</sup>	F <sub>tab</sub>
Regressão	17,00	2	8,50	9,31	19,00
Resíduos	1,83	2	0,91		
Falta de Ajuste	1,82	1	1,82	2281,50	161,14
Erro Puro	0,44	1	0,00		
Total SQ	0,001	6	3,14		

LEGENDA:<sup>a</sup>Soma dos quadrados; <sup>b</sup> Graus de liberdade; <sup>c</sup> Média dos quadrados; <sup>d</sup> Variância.

#### 5.4.2. Rendimento e cinética de extração utilizando sc-CO<sub>2</sub> na presença de etanol.

As mesmas condições de temperatura e pressão utilizadas nas extrações com sc-CO<sub>2</sub> foram utilizadas para as extrações com adição de cossolvente (etanol), na condição de razão mássica solvente: sólidos de 1:1, mesma proporção utilizada por Baumgardt *et al.* (2016). Os rendimentos de extração são apresentados na TABELA 15.

A temperatura de 80 °C propiciou os maiores rendimentos de extração, sendo o maior deles 31,1%, valor próximo ao obtido na extração convencional com etanol após 12 h de extração. Nota-se que, nessa temperatura, o aumento da pressão não exerceu influência sobre o rendimento final das extrações, fato semelhante ao demonstrado por Baumgardt *et al.* (2016) para *Nannochloropsis oculata* a 80°C e nas pressões de 150, 200 e 250 bar. Apesar desta tendência, os valores de rendimento obtidos experimentalmente não foram equivalentes, enquanto que para Baumgardt *et al.* (2016) o rendimento máximo obtido foi cerca de 5% a 80 °C e 150 bar, a extração nesta mesma condição para *Choricystis minor* var. *minor* gerou um rendimento de 31,57%. Estes resultados indicam que a 80 °C pode-se reduzir a pressão de operação do equipamento mantendo-se o rendimento mássico de extração elevado, o que significa um menor custo no processo de extração.

TABELA 15 - RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO SC-CO<sub>2</sub> COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento mássico da extração (%)
150	40	12,41
150	80	31,57
250	40	9,63
250	80	31,23
200	60	18,17 ± 0,68 <sup>a</sup>

LEGENDA: <sup>a</sup>Média e desvio da duplicata do ponto central do planejamento.

A influência dos fatores pressão, temperatura, a interação entre estes fatores, os resultados de rendimento de extração que constam na TABELA 16 foram submetidos à análise de variância. O modelo apresentou pequena falta de ajuste, considerando um intervalo de confiança de 95%, como pode ser verificado pelos valores de F apresentados na TABELA 16 e pelo elevado valor de R<sup>2</sup>(0,970) e da máxima variância explicada (0,926).

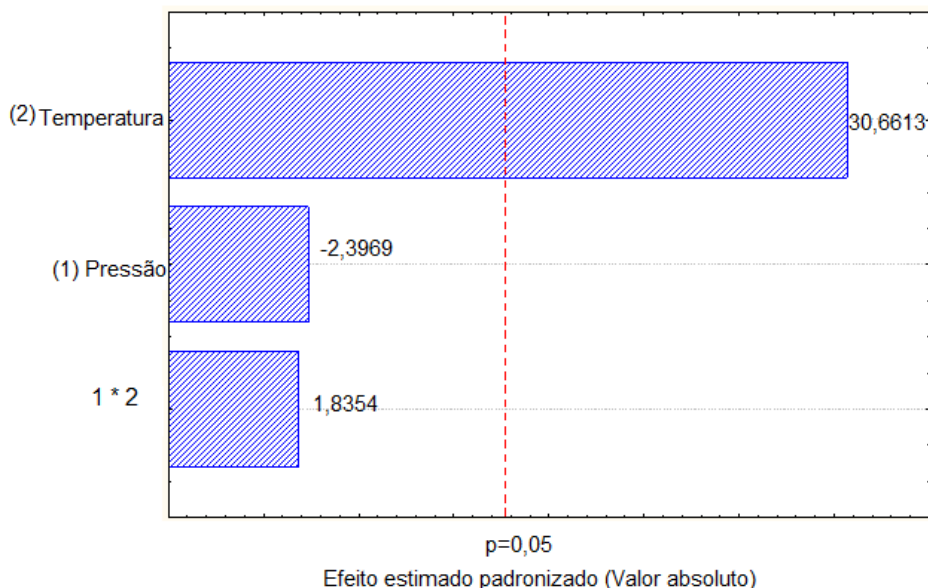
TABELA 16 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM SC-CO<sub>2</sub> E ETANOL

Fator	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	F <sup>d</sup>	F <sub>tab</sub>
Regressão	419,26	2	209,63	32,85	19,00
Resíduos	12,76	2	6,38		
Falta de Ajuste	12,32	1	12,32	27,89	161,14
Erro Puro	0,44	1	0,44		
Total SQ	432,03	6	72,00		

LEGENDA:<sup>a</sup>Soma dos quadrados; <sup>b</sup> Graus de liberdade; <sup>c</sup> Média dos quadrados; <sup>d</sup> Variância.

O Diagrama de Pareto foi construído para auxiliar a avaliação dos fatores com maior influência sobre o rendimento global das extrações (FIGURA 15). Avaliando-se os resultados, verifica-se que apenas a temperatura apresentou influência significativa sobre o rendimento global das extrações, quando se utiliza sc-CO<sub>2</sub> com etanol como cossolvente.

FIGURA 15 - DIAGRAMA DE PARETO DAS VARIÁVEIS PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM SC-CO<sub>2</sub> ASSOCIADO AO ETANOL COMO COSSOLVENTE

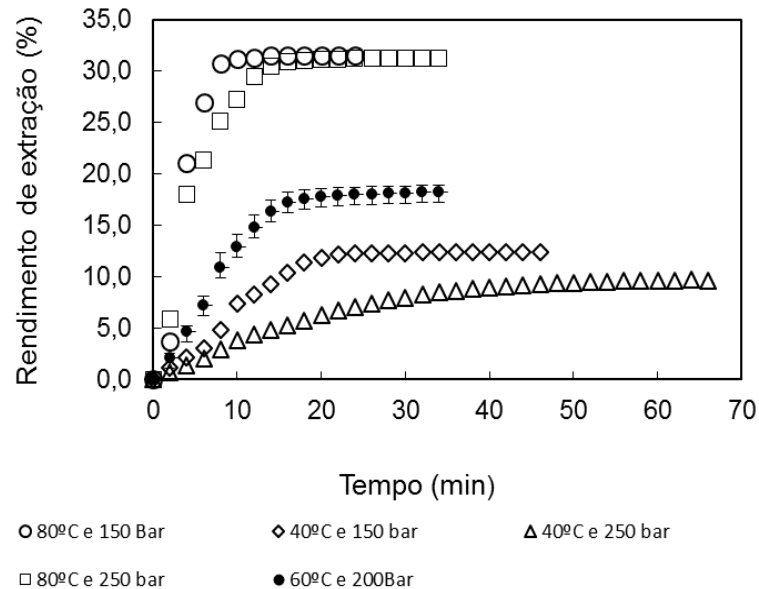


As curvas de extração dos experimentos realizados com o etanol como cossolvente são apresentadas na FIGURA 16. Em todas as condições de temperatura e pressão, as curvas de extração apresentaram as três fases características de extração com fluido supercrítico, exceto para a condição de 40°C e 250 bar, que apresentou baixas taxas de extração para todo o intervalo de tempo avaliado. Observa-se que as velocidades iniciais de extração foram maiores quanto maior a temperatura para o mesmo valor da pressão de operação. A maior taxa de extração foi observada a 80 °C e 150 bar, condição em que a cinética atingiu rendimento máximo em aproximadamente 8 min. Para essa mesma temperatura, observa-se que o mesmo rendimento foi atingido a 250 bar a partir de aproximadamente 15 min de extração.

Devido a característica do processo de extração com sc-CO<sub>2</sub> e etanol como cossolvente é importante mencionar que a solubilidade do sistema apresenta papel preponderante no perfil das curvas globais de extração. A adição de etanol em conjunto com a matéria-prima seguida da adição do solvente pressurizado (sc-CO<sub>2</sub>) no início da extração facilita a transferência de massa do sistema para o interior das partículas da matéria-prima e, por consequência, promove um contato mais efetivo entre soluto e sistema solvente (etanol + sc-CO<sub>2</sub>). Dessa forma, a utilização de um agente carreador, no caso o sc-CO<sub>2</sub>, minimiza a resistência a transferência de

massa e aumenta as taxas de extração convectiva, conforme pode ser observado nas curvas de extração da FIGURA 16 para as condições de 80 °C a 150 e 250 bar.

FIGURA 16 - CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO VARIANDO CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM SC-CO<sub>2</sub> E ETANOL



LEGENDA: Símbolo preenchido refere-se à média de uma duplicata

As alterações na transferência de massa e solubilidade do sistema fica absolutamente evidenciada quando comparados os resultados e as curvas globais de extração do óleo de microalgas com sc-CO<sub>2</sub> sem e com a adição de etanol, em que a eficiência da extração com a adição de etanol chega a 100% quando a extração exaustiva em Soxhlet (usando etanol como solvente) é tomada como referência (vide TABELA 11).

Comparando-se os resultados apresentados nas TABELAS 13 e 15 foi possível verificar que a presença do etanol promoveu aumento significativo no rendimento global dos processos de extração em todas as condições testadas. Cabe ressaltar que a temperatura de extração de 80 °C levou aos maiores rendimentos tanto na extração sem cossolvente (6,66%) como na extração com cossolvente (31,57%). A presença do etanol aumentou o rendimento da extração em cerca de 5 vezes, semelhante ao aumento verificado por Baumgardt *et al.* (2016) para a microalga marinha *Nannochloropsis oculata*.

## 5.5. CINÉTICA E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO PROPANO PRESSURIZADO.

### 5.5.1. Rendimento e cinética de extração utilizando apenas propano.

Os rendimentos mássicos das extrações obtidos após 120 min de extração em leito fixo utilizando propano pressurizado como solvente são apresentados na TABELA 17.

TABELA 17 - RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO PROPANO SEM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento mássico da extração (%)	Densidade do propano(gmL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
50	40°C	5,44	0,481
50	80°C	9,07	0,400
100	40°C	5,83	0,495
100	80°C	10,53	0,435
75	60°C	8,90 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,458

LEGENDA: <sup>a</sup> Dados de Linstrom; Mallard (2012); <sup>b</sup> Média e desvio da duplicata do ponto central do planejamento.

O teste de ANOVA a um nível de confiança de 95% foi aplicado aos dados de rendimento de extração com propano (TABELA 17) e esses se encontram apresentados na TABELA 18. A ANOVA exibiu baixo coeficiente de regressão (0,906) e um baixo coeficiente de variância explicável (0,767) e esse fato, aliado a valores de F não satisfatórios (TABELA 18), indicaram que o modelo não é adequado para prever o processo de extração usando propano, resultado semelhante ao observado anteriormente para extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

A partir da TABELA 17 observa-se que as alterações na temperatura e pressão provocaram pequenas alterações nos valores de densidade deste solvente. No entanto, quando comparados os resultados de extração, obtidos em diferentes temperaturas para uma mesma condição de pressão, observa-se aumento expressivo no rendimento da extração. A melhor condição de rendimento para a extração de óleo de microalga foi obtida a 80 °C e 100 bar (10,53%), seguido de 9,07% a 50 bar. Observa-se que, nessas condições de pressão, a densidade do propano pressurizado é menor do que a 40°C. Logo, é possível inferir que há um

aumento na solubilidade do óleo de microalga de acordo com o aumento da temperatura que suplanta a perda de poder de extração do solvente devido ao decréscimo de sua densidade. Ainda, os resultados podem ser analisados com base nas propriedades de transporte do sistema contendo matriz vegetal (microalga *Choricystis minor* var. *minor* e suas características morfológicas) e propano pressurizado, os quais indicam que um aumento na temperatura leva a uma diminuição da viscosidade tanto do propano quanto do soluto e a um aumento na difusividade mássica do solvente na matriz, o que de fato contribui para a diminuição da resistência da transferência de massa do sistema. Cabe ressaltar que na temperatura de 80 °C os rendimentos obtidos no presente estudo foram bastante superiores aos apresentados por Baumgardt *et al.* (2016), no qual em condições semelhantes (80 °C e 250 bar) o rendimento máximo foi de aproximadamente 3%.

TABELA 18 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AOS DADOS DE RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM PROPANO PRESSURIZADO.

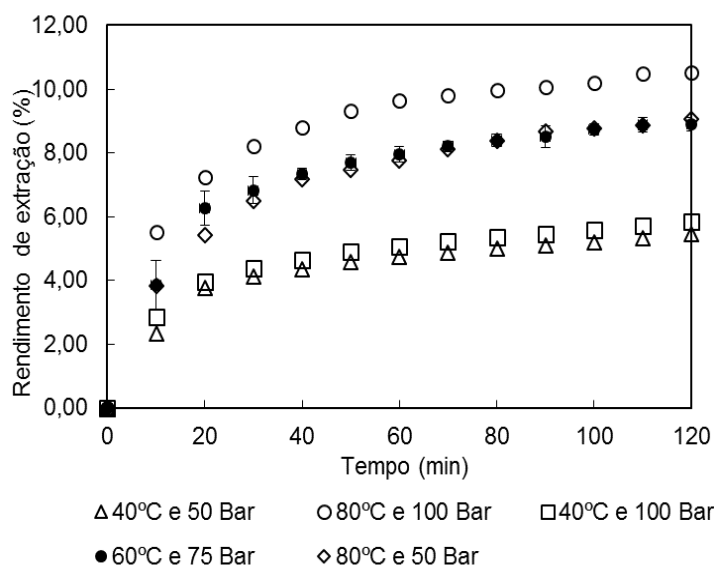
Fator	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	F <sup>d</sup>	F <sub>tab</sub>
Regressão	18,49	2	9,24	9,68	19,00
Resíduos	1,91	2	0,95		
Falta de Ajuste	1,86	1	1,86	41,43	161,14
Erro Puro	0,045	1	0,045		
Total SQ	20,40	6	3,39		

LEGENDA:<sup>a</sup>Soma dos quadrados; <sup>b</sup> Graus de liberdade; <sup>c</sup> Média dos quadrados; <sup>d</sup> Variância

As análises e comentários realizados para os resultados apresentados na TABELA 17 são corroboradas pelas curvas globais de extração do óleo de microalga com propano pressurizado. A partir desses dados (FIGURA 17), observa-se que as curvas de extração obtidas nas condições de 40 °C e pressões de 50 bar e 100 bar apresentaram valores bastante próximos, o que demonstra que a pressão não exerce influência significativa para a extração baseada no uso de propano pressurizado como solvente. Um comportamento semelhante é observado para a isoterma a 80 °C, onde uma variação mais acentuada no rendimento final da extração pode ser observada para as pressões de 50 e 100 bar. Por outro lado, as curvas cinéticas demonstram que o aumento de temperatura promoveu aumento na velocidade inicial das extrações, bem como no rendimento global obtido após 120

min de extração, sendo que a condição de 80 °C e 100 bar apresentou a maior taxa e rendimento de extração (10,53%).

FIGURA 17 - CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO VARIANDO CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO SEM ETANOL



LEGENDA: Símbolo preenchido refere-se à média de uma duplicata

Todas as condições estudadas ficaram próximas da terceira fase de extração após 120 min, quando a taxa de extração decaiu significativamente de modo semelhante ao observado nas curvas cinéticas de Baumgardt *et al.* (2016). Contudo, o rendimento obtido para *Choricystis minor* var. *minor* na melhor condição de extração superou o rendimento obtido por esses autores para microalga *Nannochloropsis oculata*.

#### 5.5.2. Rendimento e cinética de extração utilizando propano associado ao etanol.

Os dados referentes aos rendimentos globais das extrações com propano e etanol como cossolvente são apresentados na TABELA 19. O aumento de temperatura a 50 bar e a 100 bar promoveu um aumento no rendimento das extrações, indicando um aumento na solubilidade dos componentes presentes na microalga. A condição que apresentou o maior rendimento foi a de maior temperatura e menor pressão (80 °C e 50 bar).

Os resultados da TABELA 19 foram submetidos à análise ANOVA a um nível de 95% de confiança. O modelo desenvolvido se mostrou satisfatório devido ao

elevado coeficiente de regressão (0,979) e elevado valor de  $R^2$  explicado, fato corroborado pelo valor de F da regressão ser maior do que o valor de F tabelado (Teste de Fisher para 95% de confiança) conforme apresentado na TABELA 20. A partir desta análise foi possível elaborar o Diagrama de Pareto da FIGURA 18 para se avaliar a influência das variáveis sobre o rendimento de extração.

TABELA 19- RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO E ETANOL.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento mássico da extração (%)
50	40	13,62
50	80	27,54
100	40	13,33
100	80	23,58
75	60	21,07 ± 0,2*

LEGENDA: \* Média e desvio padrão da duplicata do ponto central do planejamento

TABELA 20 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM PROPANO E ETANOL.

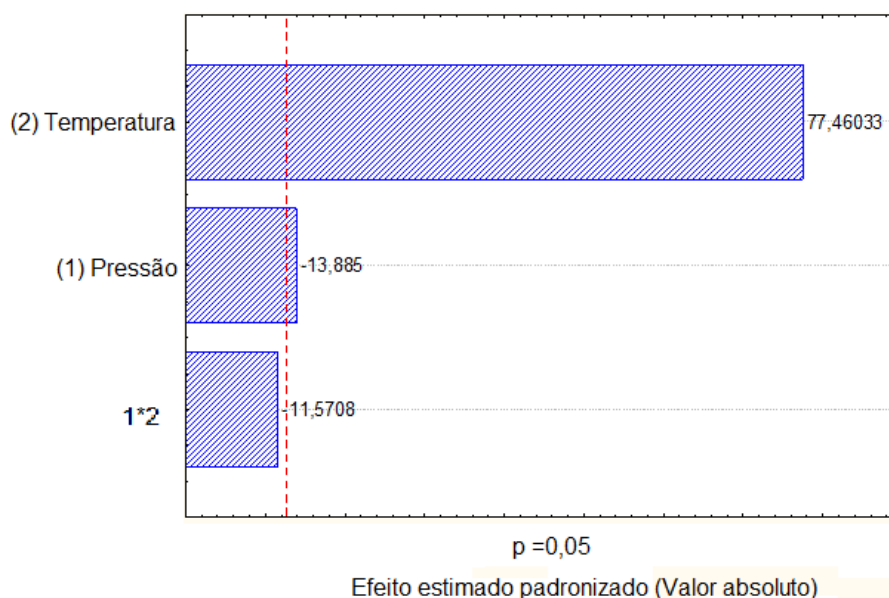
Fator	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	F <sup>d</sup>	F <sub>tab</sub>
Regressão	153,11	2	76,55	47,14	19,00
Resíduos	3,25	2	1,62		
Falta de Ajuste	3,22	1	3,22	133,22	161,40
Erro Puro	0,02	1	0,02		
Total SQ	156,36	6	26,06		

LEGENDA: <sup>a</sup>Soma dos quadrados; <sup>b</sup> Graus de liberdade; <sup>c</sup> Média dos quadrados; <sup>d</sup> Variância.

O Diagrama de Pareto demonstra que a temperatura é a única variável com efeito positivo sobre o rendimento da extração, enquanto que a pressão apresenta um efeito negativo (-13,885 p.p) no limiar do intervalo de confiança de 95%. Na temperatura de 80°C, nota-se que o aumento de pressão diminuiu ligeiramente o rendimento da extração, comportamento diferente do observado por Baumgardt *et al.* (2016), que obteve rendimentos maiores à medida que a pressão de operação foi aumentada. Apesar disto, o rendimento obtido na melhor condição para *Choricystis*

*minor var. minor* (27,54%) é o triplo do obtido pelos autores do referido trabalho para a microalga marinha *Nannochloropsis oculata*.

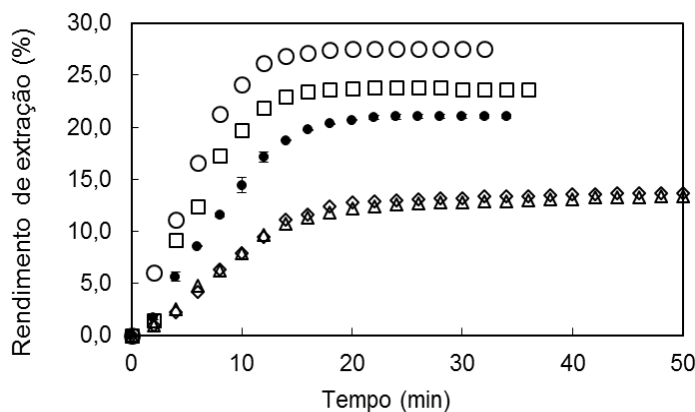
FIGURA 18 - DIAGRAMA DE PARETO DAS VARIÁVEIS PRESSÃO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM PROPANO E ETANOL



Em relação à cinética de extração, observa-se a partir das curvas apresentadas na FIGURA 19 que todas as extrações alcançaram a terceira fase, denominada fase de difusão controlada, e que a curva com maior taxa extração foi obtida na condição de 80 °C e 50 bar. Nesta condição, depois de decorridos 16 min de extração, a curva cinética alcançou o platô, sendo que, de modo geral, o aumento de temperatura e a redução da pressão contribuíram para o aumento das taxas de extração em todas as condições experimentais testadas nesse estudo.

Comparando-se os resultados apresentados nas TABELAS 17 e 19 é possível verificar que a presença do etanol em todas as condições testadas propiciou um grande aumento na taxa de extração, bem como no rendimento global da extração. Já a curva de extração para o uso do propano na melhor condição, sem adição de cossolvente, apresentou acréscimos menos significativos de rendimento após 90 min da extração, enquanto que, nas extrações empregando etanol, não houve acréscimos no rendimento a partir de 16 min. Tais dados revelam que a presença do etanol tornou a extração bem mais veloz.

FIGURA 19 - CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO VARIANDO CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO PARA EXTRAÇÕES COM PROPANO COM ETANOL



◇ 40°C e 50bar      ○ 80°C e 50 bar      △ 40°C e 100 bar

□ 80°C e 100 bar      ● 60°C e 75 bar

LEGENDA: Símbolo preenchido refere-se a média de uma duplicata

## 5.6. COMPARAÇÃO ENTRE AS EXTRAÇÕES COM PROPANO E CO<sub>2</sub> PRESSURIZADO

A partir da comparação entre as cinéticas e os rendimentos das extrações realizadas com propano pressurizado e sc-CO<sub>2</sub> sem a adição de cossolvente, percebe-se que o propano se mostrou mais eficiente que o CO<sub>2</sub> supercrítico, o qual apresentou um rendimento mássico de extração de 10,53%. Ainda, a comparação entre as curvas cinéticas (FIGURA 20) revela que a extração com propano apresentou uma taxa de extração maior que extração com CO<sub>2</sub> e isto se deve à maior solubilidade dos componentes do óleo no propano pressurizado, conforme já relatado por outros autores (BAUMGARDT *et al.*, 2016; CORSO *et al.*, 2010).

Fica evidente pelo aspecto da curva de extração que a extração com propano comprimido se aproximou mais da terceira fase, se comparado ao sc-CO<sub>2</sub>. Ademais seria necessário um tempo superior a 120 min para que o rendimento de extração com sc-CO<sub>2</sub> alcançasse o mesmo rendimento obtido pelo propano, dispendendo com isso um consumo muito maior de gás pressurizado.

No intuito de avaliar o efeito da polaridade do cossolvente durante o processo de extração, testes adicionais foram realizados no ponto central do planejamento substituindo o etanol pelo hexano. A comparação entre as curvas de extração para esses dois cossolventes (hexano e etanol) estão apresentadas na FIGURA 21.

FIGURA 20 - CURVAS PARA AS EXTRAÇÕES NAS MELHORES CONDIÇÕES COM PROPANO PRESSURIZADO (80°C E 100 BAR) E (SC-CO<sub>2</sub>) (80°C E 250 BAR).

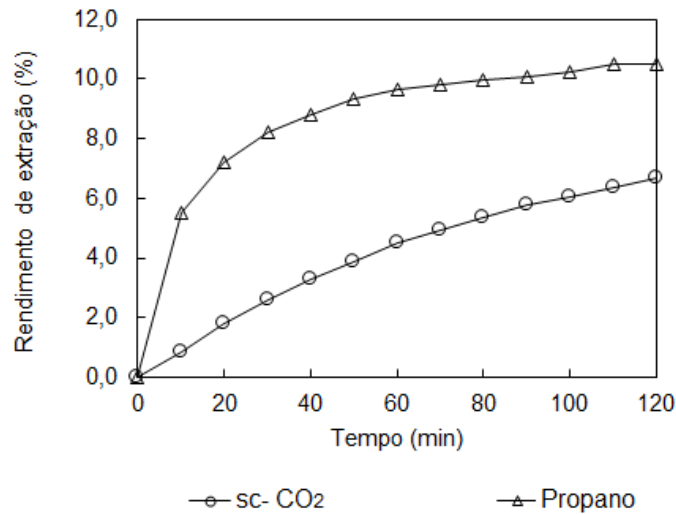
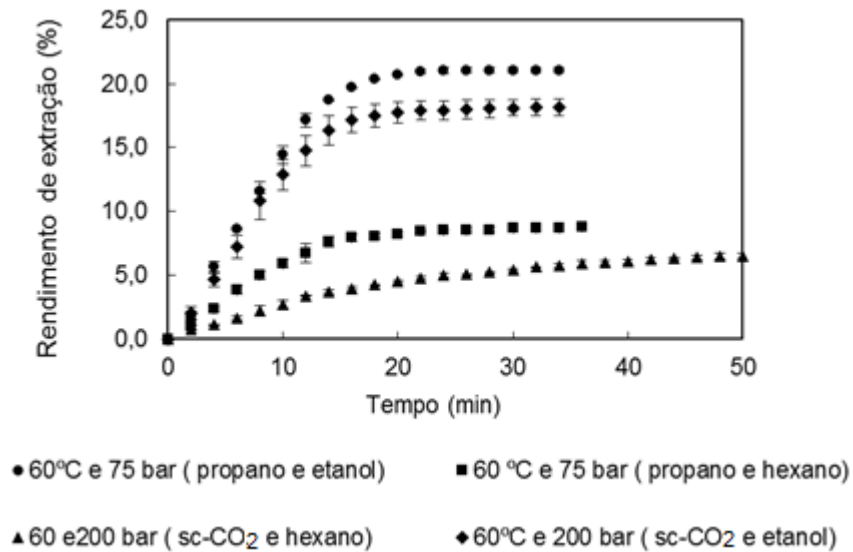


FIGURA 21 - CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO PARA OS PONTOS CENTRAIS DOS PLANEJAMENTOS COM PROPANO E SC-CO<sub>2</sub> ACOMPANHADO DOS COSSOLVENTES HEXANO E ETANOL.



LEGENDA: Símbolo preenchido refere-se à média de uma duplicata

A partir da comparação apresentada na FIGURA 21, observa-se que uso do etanol como cossolvente possibilitou a obtenção dos maiores rendimentos de extração se comparados ao uso do hexano e das curvas cinéticas com maiores taxas de extração (FIGURA 21). O maior rendimento global obtido com etanol pode ser atribuído a sua maior polaridade, que possibilita a extração de uma maior quantidade de compostos orgânicos da matriz.

A extração com sc-CO<sub>2</sub> e hexano como cossolvente, diferentemente das demais, não atingiu a terceira fase. Assim, essa foi a combinação de menor eficiência dentre os solventes testados devido não só ao baixo rendimento, mas também às taxas mais lentas de extração, o que acarreta no aumento do tempo para a obtenção de maiores quantidades de extrato e, portanto, maior consumo de solvente.

Conforme descrito na TABELA 21, a melhor eficiência de extração foi obtida com propano e etanol, que apresentou o maior rendimento (21,07%) em pressões de operação mais brandas. A utilização de pressões mais baixas é um fator determinante para a viabilidade econômica de um processo baseado no uso de fluido pressurizado como solvente, com ou sem o uso de cossolventes, pois diminui possíveis custos de instalação, manutenção e operação dos equipamentos de extração e separação.

TABELA 21 - RENDIMENTO GLOBAL DAS EXTRAÇÕES COM SOLVENTES PRESSURIZADOS

<b>Solvente</b>	<b>Cossolvente</b>	<b>Rendimento da extração(%)</b>
sc-CO <sub>2</sub>	nenhum	4,45 ± 0,02
	etanol	18,17 ± 0,68
	hexano	7,01 ± 0,06
Propano	nenhum	8,90 ± 0,11
	etanol	21,07 ± 0,2
	hexano	8,75 ± 0,06

A TABELA 21 também revela que o uso de sc-CO<sub>2</sub> com etanol não apresentou uma diferença significativa de rendimento se comparado ao uso de propano com etanol, porém, a condição de pressão (200 bar) exigida para maximizar rendimentos foi mais alta do que para as extrações com propano.

A presença do hexano como cossolvente nas extrações com fluidos pressurizados se mostrou interessante tecnicamente apenas para as extrações com sc-CO<sub>2</sub>, em que foi observado um aumento no rendimento de extração de 4,45% para 7,01%. Por outro lado, a adição de hexano ao propano não contribuiu para aumentar o rendimento de extração. Cabe ressaltar que o propano e o hexano são compostos apolares e que nestas condições ambos estão liquefeitos (LINSTROM e MALLARD, 2012); portanto, a presença de hexano pouco contribuiu para modificar

as características de polaridade do meio de extração, visando aumentar a solubilidade do óleo de microalga no propano pressurizado.

As condições de maior rendimento para as extrações sem adição de cossolvente, com adição de cossolvente (etanol) e no ponto central dos planejamentos com adição de hexano e etanol foram submetidos à determinação de seus respectivos teores de ésteres totais, conforme metodologia descrita no item 4.2.7. Os dados apresentados na TABELA 22 mostram que o teor de ésteres obtidos a partir dos extratos oriundos das extrações com solventes pressurizados sem o uso de etanol foi maior se comparado às extrações com a presença deste cossolvente. Segundo descrito por Baumgardt *et al.* (2016), a maior polaridade do etanol permite a extração não apenas de lipídios neutros, mas principalmente de outros compostos polares presentes nas microalgas, tais como, pigmentos, esteróis entre outros que não são passíveis de serem esterificados.

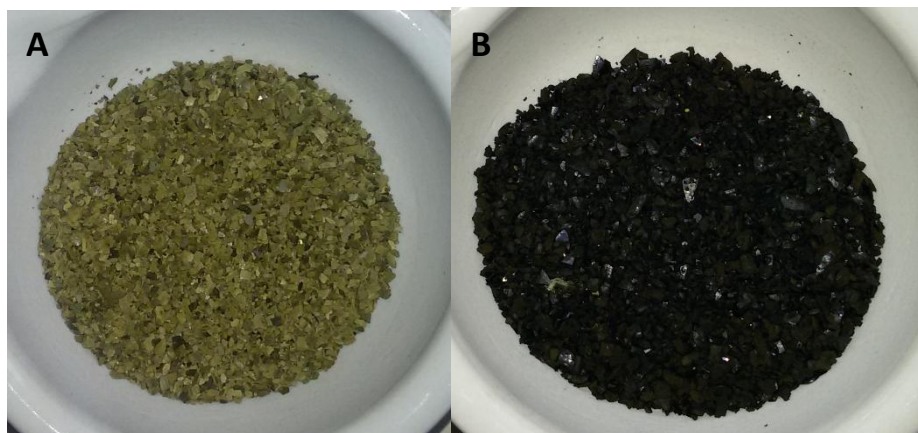
O aspecto dos resíduos das extrações sem e com cossolvente, cujas imagens podem ser observadas na FIGURA 22, indica a capacidade de extração de pigmentos do etanol, pois os resíduos das extrações são verdes claros enquanto os resíduos das extrações sem etanol apresentam coloração verde escura. Todavia, analisando-se o teor de ésteres obtidos em relação à massa de microalga carregada no extrator, o ensaio que propiciou maior teor de ésteres para as extrações com  $\text{sc-CO}_2$  foi o T3, no qual se utilizou etanol como cossolvente. Nesta situação, o rendimento global compensou o menor teor de material esterificável do produto, comparativamente à melhor condição de extração sem cossolvente (T7).

Avaliando-se os resultados da TABELA 22 para os ensaios T9 e T28 é possível perceber que o teor de ésteres proveniente do extrato T28 ( $93,6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) é o dobro do que na condição T9 ( $45,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), demonstrando que o uso combinado de  $\text{CO}_2$  e hexano produz óleo com maior potencial para aplicação em biodiesel. Resultados semelhantes são observados para o ensaio na condição T12 ( $98,6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), porém, o rendimento mássico das extrações dos ensaios T9, T28 e T12 são significativamente diferentes, bem como o rendimento em ésteres em relação à massa de biomassa.

TABELA 22 - RENDIMENTO EM ÉSTERES PARA OS PROCESSOS EXTRATIVOS COM GASES PRESSURIZADOS ASSOCIADOS OU NÃO A COSSOLVENTES

Parâmetros de extração	Extração com sc-CO <sub>2</sub>				
	T7	T3	T12	T9	T28
Condição	80°C/250bar	80°C/150bar	60°C/200bar	60°C/200bar	60°C/200bar
Cossolvente	ausente	etanol	ausente	etanol	hexano
Rendimento de extração (%)	6,7	31,6	4,7	18,6	7,02
Teor de ésteres nos extratos (g 100 g <sup>-1</sup> )	86,8 ±10,2	52,9 ± 0,2	98,6 ± 7,9	45,9 ± 5,8	93,6± 10,7
Teor de ésteres na biomassa (g 100 g <sup>-1</sup> ) (A)	5,8	16,7	4,4	8,6	6,6
Teor de ésteres nos resíduos (g 100 g <sup>-1</sup> ) (B)	17,7 ± 2,9	2,9 ± 0,3	18,4 ± 0,8	15,8 ± 0,7	21,2 ± 2,5
A+ B	23,44	19,6	22,83	24,38	27,87
Parâmetros de extração	Extração com propano				
	T 17	T 18	T 23	T 24	T 27
Condição	80°/100bar	80°C/50bar	60°C/75bar	60°C/75bar	60°C/75bar
Cossolvente	ausente	etanol	ausente	etanol	hexano
Rendimento de extração (%)	10,5	27,5	9,0	21,2	8,7
Teor de ésteres nos extratos (g 100 g <sup>-1</sup> )	73,2 ±8,7	39,0 ± 4,8	82,8 ± 9,2	49,1 ± 7,1	75,9 ± 2,2
Teor de ésteres na biomassa (g 100 g <sup>-1</sup> ) (A)	7,7	10,7	7,5	10,4	6,5
Teor de ésteres nos resíduos (g 100 g <sup>-1</sup> ) (B)	16,5 ± 9,2	17,0 ± 0,1	8,4 ± 0,3	18,8 ± 0,7	19,1 ± 0,2
A + B	24,2	27,7	15,9	28,38	25,6

FIGURA 22 - RESÍDUOS DAS EXTRAÇÕES A 80°C E 150 BAR NA PRESENÇA (A) E AUSÊNCIA DE ETANOL (B).



Ao avaliar o rendimento em ésteres em relação à massa de microalga é possível verificar que o ensaio com maior teor de ésteres é novamente o que utiliza etanol como cossolvente (ensaio T9;  $8,6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Os resultados obtidos para os ensaios T9 e T3 demonstram que, ao se utilizar o  $\text{sc-CO}_2$ , o etanol é o cossolvente mais indicado para um processo que visa a produção de ésteres de ácidos graxos. Ademais, este solvente é oriundo de fonte renovável e pouco tóxico, além de ser passível de uso como reagente em processos combinados de extração/reação para síntese de biodiesel etílico, evitando assim a necessidade da separação do solvente de extração (JESUS *et al.*, 2013).

Em relação aos dados de extração para o propano pressurizado é possível verificar que na ausência de cossolvente este gás é capaz de gerar extratos com elevado potencial para conversão em ésteres, conforme dados dos ensaios T17 e T23 que foram semelhantes aos obtidos para os ensaios T7 e T12 com  $\text{sc-CO}_2$ . Porém, quando se considera a massa de ésteres em relação à massa de biomassa empregada na extração, os ensaios com propano (T17 e T23) apresentaram um teor de ésteres superior ao obtido nos ensaios com  $\text{sc-CO}_2$ . Tal resultado se deve ao elevado rendimento mássico da extração com propano (cerca de 10%), se comparada às extrações com  $\text{sc-CO}_2$ , sendo essa diferença explicada pela maior capacidade do propano em solubilizar os triacilglicerois presentes na biomassa de microalgas (JESUS *et al.*, 2013; CORSO *et al.*, 2010).

Os ensaios com propano e cossolventes (T24 e T27) demonstraram que o hexano foi capaz de produzir extratos com maior potencial para conversão em ésteres ( $75,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) do que o etanol ( $49,1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Para as extrações com

propano, na condição de 60 °C e 75 bar, o uso do etanol propiciou o maior rendimento em ésteres em relação à massa de microalgas submetida ao ensaio (10,4 g 100 g<sup>-1</sup>).

A comparação dos resultados de maior rendimento em ésteres com propano e etanol (T24) e sc-CO<sub>2</sub> com etanol (T3), levando-se em conta a massa de microalgas empregada nos ensaios, indica que o uso de sc-CO<sub>2</sub> com etanol se mostrou mais eficiente para a extração de material passível de ser convertido em ésteres metílicos da microalga *Choricystis minor var. minor*. Por outro lado, a soma dos teores de ésteres totais, obtidos a partir da saponificação seguida de esterificação dos resíduos das extrações e dos seus respectivos extratos (vide A+B na TABELA 22), se aproximou do valor de 23,2 ± 1,9 g 100 g<sup>-1</sup> que foi determinado inicialmente para a microalga seca em estufa, ou seja, sem ser submetida a qualquer processo extrativo, usando o mesmo procedimento experimental.

As TABELAS 23 e 24 apresentam os perfis de ácidos graxos obtidos após aplicação das metodologias 4.2.7 e 4.2.8 sobre os extratos derivados das extrações com sc-CO<sub>2</sub> e propano pressurizado, respectivamente, empregando as condições do ponto central de cada um dos planejamentos na ausência e na presença de cossolventes, além da condição de maior rendimento para cada um dos gases.

A TABELA 23 indica que o ácido palmítico se encontra em teores mais elevados nos produtos dos tratamentos T3 e T9, ambos realizados com sc-CO<sub>2</sub> na presença de etanol. No entanto, pelo aumento da polaridade associado ao uso do etanol como cossolvente esse resultado ainda deverá ser confirmado em novos experimentos de extração. Por outro lado, a condição de maior rendimento de extração com sc-CO<sub>2</sub> (T12), na ausência de cossolvente, exibiu o maior teor de compostos insaturados (68,61%), mas a diferença desse com os percentuais obtidos em outras condições não permite afirmar que tais variações confirmam alguma seletividade ou comportamento preferencial ao processo de extração. A composição em compostos insaturados de todos os extratos descritos na TABELA 23 revela que esses são constituídos majoritariamente por ácidos graxos de uma única insaturação, assim como verificado anteriormente para os extratos obtidos por extração convencional (Soxhlet). Portanto, nas condições utilizadas nesse estudo, o emprego do cossolvente em diferentes condições de pressão e temperatura não alterou sensivelmente a composição do material extraído por sc-CO<sub>2</sub>.

TABELA 23 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PARA OS EXTRATOS OBTIDOS COM SC-CO<sub>2</sub>.

Ácidos graxos	C <sub>n</sub> :M <sup>a</sup>	% Área <sup>b</sup>			
		T3 <sup>c</sup>	T12 <sup>c</sup>	T9 <sup>c</sup>	T28 <sup>c</sup>
Tetradecanoico (Mirístico)	C14:0	0,64 ±0,02	0,58 ± 0,02	0,63 ±0,02	0,64 ± 0,00
4,7,10,13-Hexadecatetranoico	C16:4 (Z4, Z7, Z10, Z13)	6,87±0,11	8,09 ± 0,45	6,08 ±1,91	6,13 ± 0,00
7,10-Hexadecadienoico	C16:2 (Z7, Z10)	1,67±0,02	1,68 ± 0,10	1,57±0,16	1,50 ± 0,01
7-Hexadecenoico	C16:1 (Z7)	2,66±0,38	3,35 ± 0,75	2,49±0,36	3,19 ± 0,02
9-Hexadecenoico (Palmitoleico)	C16:1 (Z9)	1,28 ±0,05	1,28 ± 0,03	1,19 ±0,01	1,43 ± 0,00
6-Hexadecenoico	C16:1(Z6)	2,78 ±0,03	2,79 ± 0,05	2,81 ±0,04	2,97 ± 0,02
Hexadecanoico (Palmitico)	C16:0	17,75±0,60	13,12 ± 0,27	19,45± 2,02	14,68 ±0,19
6,9,12,15-Octadecatetraenoico	C18:4 (Z6, Z9, Z12, Z15)	3,06 ± 0,08	3,41 ± 0,08	2,80 ±0,62	2,94 ± 0,02
9,12-Octadecadienoico (Linoleico)	C18:2 (Z9, Z12)	10,03 ± 0,24	9,60 ± 0,07	9,98 ± 0,10	9,76± 0,11
9-Octadecenoico (Oleico)	C18:1 (Z9)	35,95 ± 0,13	35,93 ± 0,25	35,89± 0,69	36,15 ±0,16
Octadecanoico (Esteárico)	C18:0	1,05 ± 0,08	0,70 ± 0,02	1,17 ±0,11	1,03 ±0,05
Saturados	-	20,02	15,64	21,69	17,32
Insaturados	-	65,47	68,27	64,43	64,99
Monoinsaturados	-	40,18	44,14	44,28	44,09
Di-insaturados	-	11,70	11,17	11,60	11,27
Tri-insaturados	-	0,23	0,22	0,18	0,23
Poli-insaturados	-	9,93	11,49	11,15	9,07

LEGENDA: (a) Número de carbonos da cadeia alquílica dos ácidos graxo sem relação ao número de ligações duplas; (b) Condições de ensaios conforme descritos na TABELA 22, considerando apenas os componentes com área superior a 0,5% da área total do cromatograma; (c) T3(80 °C e150 bar com etanol); T12 (60 °C e 200 bar); T9 (60 °C e/ 200 bar com etanol); T28 (60 °C e200 bar com hexano).

TABELA 24 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PARA OS EXTRATOS OBTIDOS COM PROPANO PRESSURIZADO.

Ácidos graxos	C <sub>n</sub> :M <sup>a</sup>	% Área <sup>b</sup>			
		T18 <sup>c</sup>	T23 <sup>c</sup>	T24 <sup>c</sup>	T27 <sup>c</sup>
Tetradecanoico (Mirístico)	C14:0	0,71 ±0,01	0,65 ±0,00	0,60 ±0,09	0,63± 0,01
4,7,10,13-Hexadecatetraoico	C16:4 (Z4, Z7, Z10,Z13)	6,22±0,00	7,82 ± 0,51	7,56± 0,58	8,08 ±0,05
7,10-Hexadecadienoico	C16:2 (Z7, Z10)	1,74±0,06	1,65± 0,04	1,78± 0,00	1,63 ± 0,03
7-Hexadecenoico	C16:1 (Z7)	2,34 ±0,01	3,32± 0,23	2,72± 0,07	3,49± 0,04
9-Hexadecenoico (Palmitoleico)	C16:1 (Z9)	1,80 ±0,06	1,35± 0,07	1,64 ±0,61	1,26± 0,00
6-Hexadecenoico	C16:1 (Z6)	3,09 ±0,04	3,04± 0,26	2,93± 0,06	2,78± 0,01
Hexadecanoico (Palmitico)	C16:0	20,16± 0,67	14,25± 0,78	18,50± 0,89	13,10± 0,13
6,9,12,15-Octadecatetraoico	C18:4 (Z6, Z9, Z12, Z15)	2,78 ± 0,28	3,24± 0,16	3,02 ±0,31	3,53 ± 0,04
9,12-Octadecadienoico (Linoleico)	C18:2 (Z9, Z12)	10,51 ± 0,19	10,00± 0,34	9,74± 0,26	9,72± 0,07
9-Octadecenoico (Oleico)	C18:1 (Z9)	35,97 ± 0,06	36,83± 0,29	37,02± 1,31	37,83± 0,58
Octadecanoico (Esteárico)	C18:0	1,27 ± 0,12	0,82± 0,01	0,99 ±0,07	0,79± 0,07
Saturados	-	22,41	16,77	20,99	15,77
Insaturados	-	61,35	69,12	67,49	69,87
Monoinsaturados	-	43,19	45,74	45,18	47,81
Di-insaturados	-	12,25	11,65	11,53	11,35
Tri-insaturados	-	0,00	0,22	0,20	0,24
Poli-insaturados	-	9,00	11,06	10,58	11,61

LEGENDA: (a) Número de carbonos da cadeia alquílica dos ácidos graxos em relação ao número de ligações duplas; (b) Condições de ensaios conforme descritos na TABELA 22, considerando apenas os componentes com área superior a 0,5% da área total do cromatograma; (c) T18 ( 80°C e 50 bar com etanol); T23 ( 60°C e 75 bar);T24 ( 60° C e 75 bar, com etanol); T27 ( 60°C e 75 bar com hexano).

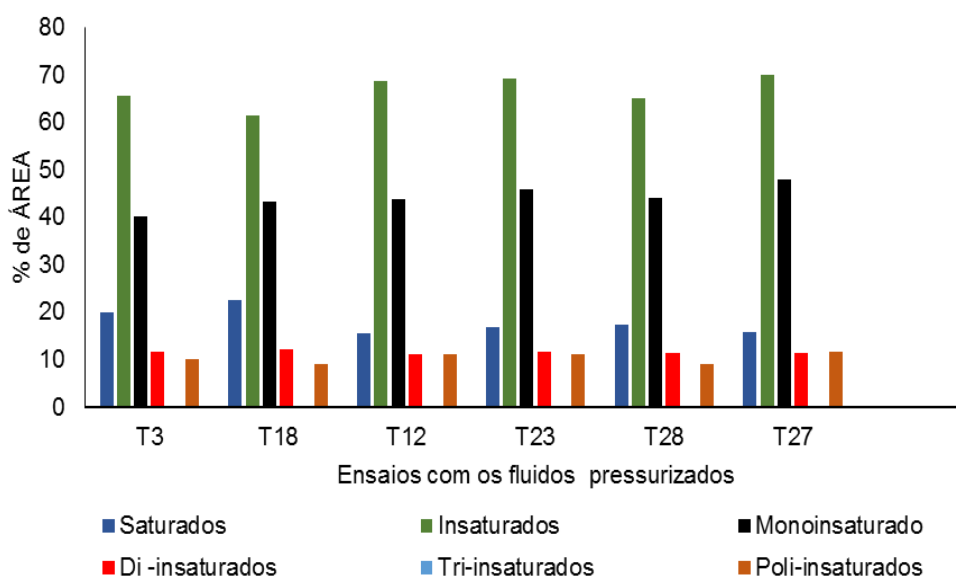
Na TABELA 24 são apresentados os resultados para o perfil lipídico dos extratos obtidos com o uso de propano associado ou não a cossolventes. O ácido palmítico foi o único composto do perfil que apresentou variações entre os perfis dos extratos, da mesma forma como anteriormente observado nos testes com sc-CO<sub>2</sub>. Todos os extratos apresentaram teores de ácidos graxos insaturados superiores a 60%, todavia, o percentual de insaturados foi menor para condição de maior rendimento de extração (T18), demonstrando que esta condição de temperatura e pressão possa ter sido menos seletiva para este tipo de componente. No entanto, esse resultado também deverá ser confirmado com a realização de novos experimentos para confirmar ou não as tendências observadas.

A comparação da composição química dos extratos obtidos com propano se assemelha ao perfil dos extratos obtidos com CO<sub>2</sub>, conforme os cromatogramas apresentados no APÊNDICE 1 (FIGURAS A.1-4 a A.1-11). Os perfis lipídicos dos extratos obtidos com os diferentes fluidos pressurizados também foram semelhantes aos verificados nas extrações convencionais, ou seja, o uso de fluido pressurizado não alterou a seletividade do processo de extração. Embora os perfis tenham sido semelhantes, cabe ressaltar que as extrações com fluido pressurizado podem ser consideradas vantajosas porque foram mais velozes e mais eficientes (cerca de 100%) que as extrações convencionais.

Finalmente, comparando-se de forma agrupada os perfis cromatográficos dos extratos de maior rendimento, obtidos sob diferentes condições na ausência e na presença de cossolvente (etanol e hexano), percebe-se que todos apresentaram maior proporção de ácidos graxos insaturados (FIGURA 23) e esses se encontram formados majoritariamente por compostos monoinsaturados (>40%, como demonstram as TABELAS 23 e 24). Comparado a outras matrizes lipídicas como o óleo de soja, os ésteres metílicos da microalga *Choricystis minor var. minor* provavelmente apresentarão estabilidade oxidativa relativamente boa, parcialmente comprometida pela presença de 10% de ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, a presença de apenas 16-22% de ácidos graxos saturados e a ausência de componentes de alta massa molar nessa categoria química garante que os ésteres metílicos dessa microalga apresentarão boas propriedades de fluxo a frio. Além disso, quaisquer desconformidades nessas duas propriedades poderiam ser facilmente corrigidas com o uso de aditivos químicos. Já em relação a outras

propriedades combustíveis, como número de cetano, viscosidade cinemática, massa específica e ponto de fulgor, dentre outras, não há quaisquer elementos que possam denegrir o potencial dessa microalga como matéria-prima para a produção de um biodiesel perfeitamente compatível com as normas internacionais de qualidade.

FIGURA 23 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS OBTIDOS EM FLUIDO PRESSURIZADO, ANALISADOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS NA FORMA DE ÉSTERES METÍLICOS.



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados das extrações convencionais demonstraram que a *Choricystis minor var. minor* apresentou alto rendimento de extração em hexano (10,6%) indicando que esta microalga tem elevado teor de lipídios neutros. O etanol propiciou rendimento de extração (30,5%) maior se comparado ao hexano e por isso foi testado como cossolvente para as extrações com fluido pressurizado (CO<sub>2</sub> e propano). O hexano também foi testado devido à elevada taxa de conversão em ésteres de seu extrato (cerca de 80%).

A temperatura e a pressão influenciaram o rendimento das extrações com fluido pressurizado, sendo que o gás propano propiciou um maior rendimento em pressões de operação menores, se comparado ao sc-CO<sub>2</sub>. O uso de cossolventes, hexano ou etanol, aumentou o rendimento de extração, assim como tornou a cinética de extração mais veloz, diminuindo o consumo dos gases testados. No que se refere ao rendimento mássico de extração e ao rendimento em relação à massa

de microalga inicialmente submetida ao ensaio, o etanol se mostrou como o cossolvente de maior eficácia.

Para as extrações com cossolvente, a temperatura foi o fator que exerceu maior influência sobre os rendimentos mássicos. O uso de etanol diminuiu os teores de ésteres totais nos extratos devido a sua capacidade de extrair outros compostos não passíveis de serem esterificados (ou não saponificáveis). Todavia, ao se considerar o teor de éster em relação à massa de microalga utilizada no ensaio, o etanol se manteve como o solvente que forneceu rendimento em ésteres superiores aos demais solventes.

A extração com sc-CO<sub>2</sub> associado ao etanol, quando realizada a 80°C e 150 bar, resultou no maior rendimento em éster (16,7 g/100 g de biomassa) dentre todas as extrações realizadas empregando gases pressurizados. Ademais, a curva de extração nesta condição atingiu seu rendimento máximo em cerca de 10 min, tempo muito inferior ao das extrações convencionais (12h), e consumiu menor volume de solvente (cerca de 30 mL), se comparado ao utilizado nas extrações convencionais (200 mL). No entanto, os extratos etanólicos, por conterem maiores teores de materiais não saponificáveis que os extratos propânicos e/ou hexânicos, provavelmente exigirão maior complexidade nas etapas de purificação do produto para aplicações combustíveis (biodiesel).

O uso do etanol como cossolvente, apesar de proporcionar um maior rendimento em ésteres em relação à massa seca de microalgas, promove a extração de pigmentos que apresentam valor econômico elevado e que precisariam ser removidos do biodiesel. Nesse contexto a extração que proporcionou o teor de ésteres mais elevado (7,7 g/100 g de biomassa), sem o uso de etanol, foi a que empregou apenas propano a 80 °C e 100 bar, sendo esta indicada para obter o maior rendimento em ésteres a partir do extrato preservando pigmentos e outros materiais lipofílicos como carotenoides na composição da biomassa extraída. Dessa forma, poder-se-ia aproveitar esse resíduo para a produção de complexos vitamínicos ou de ração animal, particularmente para peixes.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. L.; MAT YASIN, N.H.; DEREK,C.J.C.; LIM, J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p. 584-593, 2011.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário Estatístico 2017. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017#Seção 4>. Acesso em: 03/07/2017.
- ARANDA, D. A.G.; SILVA, C.C.M.; DETONI, C. Current Processes in Brazilian Biodiesel Production. **International Review of Chemical Engineering**, v.01, p. 603-608, 2009.
- BASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 496-504, 2016.
- BATISTA, G. Extração de ácidos graxos de *Chlorella pyrenoidosa* assistida por pressurização cíclica: estudo de equilíbrio e caracterização dos extratos. 112 p. **Dissertação**(Mestrado em Engenharia Química), UFPR, Curitiba, 2016.
- BATISTA,G.; SURECK, G.A.S.; BENICÁ,C.; CORAZZA, M.L.; ZANOELO, E.F. Cyclic pressurization assisted extraction of lipids from microalgae for biodiesel production: Non-equilibrium and equilibrium data lipid content. **Fuel**, v.163, p. 133-138, 2016.
- BAUMGARDT, F.L.J.; ZANDONÁ FILHO, A.; BRANDALIZE, M.V.; COSTA, D.C.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; ABREU, P.C.O.V.; CORAZZA, M.L.; RAMOS, L.P. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**,v.108, p. 89-95, 2016.
- BAUMGARDT, F.L.J. Extração de óleo de microalgas com fluidos pressurizados e avaliação de sua conversão em monoésteres graxos. 110p. **Dissertação**(Mestrado em Química), UFPR, Curitiba, 2013.
- BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. 233 p. **Dissertação**(Mestrado em Engenharia de Alimentos), UFSC, Florianópolis, 2010.

- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v.37, p. 911-917, 1959.
- BRANDALIZE, M.V. Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom. 89p. **Dissertação**(Mestrado em Engenharia Química), UFPR, Curitiba, 2014.
- CARVALHO JUNIOR, R.M. Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise *in situ*. 99 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia), UFPR, Curitiba, 2010.
- CASA CIVIL -Lei Nº 13.263, de 23 de março de 2016.Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm). Acesso em: 05/03/2017.
- CASTRO, M.D.L, PRIEGO -CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**,v. 1217, p. 2383-2389, 2009.
- CHISTI, F.L.J. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 294–306, 2007.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. Oxford University Press, 2012.
- CONVERTI, A.; CASAZZA,A.A.;ORTIZ, E.Y.; PEREGO,P.;DEL BORGHI,M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.**Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 1146-1151, 2009.
- CORDEIRO, C. S. Compostos lamelares como catalisadores em reações de (trans)esterificação (m)etílica. 167 p. **Tese** (Doutorado em Química Orgânica), UFPR, Curitiba, 2008.
- CORSO, M.P.; FAGUNDES-KLEN, M.R.; SILVA, E.A.; FILHO, L.C.; SANTOS, J.N.;FREITAS, L.S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.52, p. 56-61, 2010.
- CORREA, M.S. Extração de Inflorescência da bananeira (*Musa paradisiaca*.L) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido.80p. **Dissertação**(Mestrado em Engenharia de Alimentos), UFPR, Curitiba, 2016.
- CREMASCO, M.A.; BARNES, N.S.**Operações unitárias em sistemas particulados e fluidomecânicos**. 5ª ed, Blucher, São Paulo, 2012.

CURTIS, H.; BARNES, N.S. **Biology**. 5<sup>a</sup> ed, Worth, New York, 1989.

CZAIKOSKI, K. Cinética, composição química e atividade biológica de extratos de flores de *Eupatorium intermedium* obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido. 106 p. **Tese**(Doutorado em Engenharia de Alimentos), UFPR, Curitiba, 2014.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M.C.; SCHEER, A.P.; SANTA, O.R.D.; QUEIROGA, C.L.; CORAZZA, M.L. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO<sub>2</sub> and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145-153, 2015.

D'ALESSANDRO, E.B.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.58, p. 832-841, 2016.

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

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILELAS, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, p. 1959-1967, 2006.

D'OCA, M.G.M.; VIÊGAS, C.V.; LEMÕES, J.S.; MIYASAKI, E.K.; MORRÓN-VILLARREYES, J.A.; PRIMEL, E.G.; ABREU, P.C. Production of FAMES from several microalgal lipid extracts and direct transesterification of the *Chorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p. 1533-1538, 2011.

DUBA, K.S.; FIORI, L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.98, p. 33-43, 2015.

ENCARNAÇÃO, A.P.G. Geração de Biodiesel pelos processos de Transesterificação e Hidroesterificação uma avaliação econômica. 164 p. **Dissertação**(Mestrado em Ciências), UFPR, Curitiba, 2008.

FERREIRA, R.S.S.; MEIRELES, R.A.A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 263-269, 2002.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PERENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p.235-245, 1999.

- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405–416, 2001.
- GAUTAM, S.; PANDEY, L.K.; VINAYAK, V.; ARYA, A. Morphological and physiological alterations in the diatom *Gomphonema pseudoaugur* due to heavy metal stress. **Ecological Indicators**, v. 72, p. 67-76, 2017.
- GUINDANI, C. Emprego da Tecnologia Supercrítica para a valorização do resíduo de semente de chia (*Salvia hispânica*). 156p. **Dissertação**(Mestrado em Engenharia de Alimentos), UFSC, Florianópolis, 2014.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P.A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.
- HARTMAN, L.; LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p. 475-477, 1973.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo, 2008.
- ISLAM, M.A.; AYOKO, G.A.; BROWN, R.; STUART, D. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. **Procedia Engineering**, v. 56, p. 591-596, 2013.
- JESUS, A.A.; ALMEIDA, L.C.; SILVA, E.A.; FILHO, L.C.; EGUES, S.M.S.;FRANCESCHI, E.; FORTUNY, M.; SANTOS, A.F.; ARAÚJO, J.; SOUSA, E.M.B.D.; DARIVA, C. Extraction of palm oil using propane, ethanol and mixture as compressed solvent. **The Journal of Supercritical Fluids Journal**, v. 81, p. 245-253, 2013.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. Manual do Biodiesel. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.
- LANJEKAR, R.D.; DESHMUKH, D. A review of the effect of the composition of biodiesel on NOx emission, oxidative stability and cold flow properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 1401-1411, 2016.
- LEE, K.; SEONG, D.H.; LEE, C.G, LEE, E.Y. Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 29, p. 24-31, 2015.
- LEE, S.J.;YOON, B.D.; OH, H.M. Rapid method for the determination of lipid from the green algae *Botryococcus braunii*. **BiotechnologyTechniques**, v. 12, p. 553-556, 1998.

- LIAU, B.C.; SHEN, C.T.; LIANG, F.P.; HONG, S.E.; HSU, S.L.; JONG, T.T.; CHANG, C.M.J.; Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p.169-175, 2010.
- LINSTROM, P. J.; MALLARD, W.G. 2012. **National Institute of Standards and Technology**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid>>. Acesso em: 08/09/2016.
- LIU, J.; PAN, Y.; YAO, C.; WANG, H.; CAO, X.; XUE, S. Determination of ash content and concomitant acquisition of cell compositions in microalgae via thermogravimetric (TG) analysis. **Algal Research**, v. 12, p.149-155, 2015.
- LIVIA, M.A. Obtenção e separação de compostos bioativos de *Schinusterebinthifolius raddi* em meio supercrítico e avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas. 131p. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química), UFSC, Florianópolis, 2013.
- LOBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S.; Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Quimica Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009.
- MAHMULDU, H.M.; HAGOS, F.M.; MAMAT, R.; ADAN, A.A.; ISHAK, W.F.W.; ALENEZI, R. Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 497-509, 2017.
- MASSAROLO, K.C.; RIBEIRO, A.C.; FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S. Effect of particle size of rice bran on gamma-oryzanol content and compounds. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 54-60, 2017.
- MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MAKAREVIČIENE, V.; LEBEDEVAS, S.; RAPALIS, P.; GUMBYTE, M.; SKORUPSKAITE, V.; ŽAGLINSKIS, J. Performance and emission characteristics of diesel fuel containing microalgae oil methyl esters. **Fuel**, v. 120, p. 233-239, 2014.
- MILAO, S.; UQUICHE, E. Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.116, p. 223 – 231, 2016.

MEHER, L.C.;SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review.**Renewable and Sustainable Energy Reviews**,v.10, p. 248-268, 2006.

MEIRELES, M. A. A. Tecnologia supercrítica aplicada ao processamento de produtos naturais em leito fixo. **Monografia**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 1999.

MENEZES, R.S.; Estudo do potencial de microalgas dulcícolas como matéria-prima para a cadeia de produção de biodiesel 193 p. **Tese**(Doutorado em Ciências Ambientais), UFG, Goiânia, 2015.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.;SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H.Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Quimica Nova**, v. 36, p. 10-15, 2013.

MENEZES, R.S.; SOARES,A.T.; LOPES, R.G.; MAGNOTTI, C.; DERNER, R.B.; MORI, C.C.;VIEIRA, A.A.H.; ANTONISI FILHO, N.R.; Evaluation of fatty acid composition of the microalgae *Choricystis minor* var. *minor* according to two different nutrient feeding strategies. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 7, 043117, 2015.

MENEZES, R.S.; SOARES,A.T.; MARQUES JÚNIOR, J.G.; LOPES,R.G.; ARANTES, R.F.; DERNER, R.B.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var.*minor*: a suitable microalgae for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v.2, 2679-286, 2016.

MESOMO, M.C.; Obtenção de extrato de gengibre usando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica. 74 p. **Tese**(Doutorado em Engenharia de Alimentos), UFPR, Curitiba, 2013.

MILAO, S.; UNIQUE, E. Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.116, p. 223-231, 2016.

MOUAHID, A.; CRAMPON, C.;TOUDJI, S.A.; BADENS, E. Effects of high water contentand drying pre-treatment on supercritical CO<sub>2</sub> extraction from *Dunaliella salina* microalgae: Experiments and modelling.**The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 271-280, 2016.

- NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 19-43, 2006.
- NIGAM, S.; RAI, M.P.; SHARMA, R. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 124-129, 2011.
- NIMET, G.; SILVA, E.A.; PALÚ, F.; DARIVA, C.; FREITAS, L.S.; MEDINA NETO, M.; FILHO, L.S. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus* L.) oil with supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical propane: Experimental and modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 262-268, 2011.
- ONCEL, S.S.; Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 26, p. 241-264, 2013.
- OSAKI, M.; BATALHA, M.O. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: Realidade e Desafio. **Organizações Rurais e Agroindustriais** p. 227-242, 2011.
- PEDERSETTI, M.M.; Análise dos efeitos da temperatura e pressão na extração supercrítica do óleo essencial de canola com dióxido de carbono supercrítico e propano pressurizado. 74 p. **Dissertação**(Mestrado em Engenharia Química), UNIOESTE, Toledo, 2008.
- PEREIRA, C.M.P.; HOBUSS, C.B.; MACIEL, J.V.; FERREIRA, L.R.; DEL PINO, F.B.; MESKO, M.F. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, p. 2013-2018, 2012.
- POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W.M.A.W. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.61, p. 245–257, 2016.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.28-37, 2001.
- RAVEEDRAN, P.; IKUSHIMA, Y.; WALLEN, S.L. Polar Attributes of Supercritical Carbon Dioxide. **Accounts of Chemical Research**, v.38, p.478-485, 2004.
- RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M.; Biodiesel – Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.31,p.68-76, 2003.

- RAMOS, L.P.; SILVA, F.R.; MANGRICH, A.S.; CORDEIRO, C.S. Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 285-405, 2011.
- RENAUDL, S.M.; PARRY, D.L.; LUONG-VAN, T. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. **Journal of Applied Phycology**, v. 84, p. 337-345, 1994.
- SANTANA, A.; JESUS, S.; LARRAYOZ, M.A.; FILHO, R.M. Supercritical carbon dioxide extraction of algal lipids for the biodiesel production. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1755-1761, 2012.
- 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 na composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 23, p. 17-21, 2003.
- SANTOS, D.N.; SOUZA, L.L.; FERREIRA, N.J.; OLIVEIRA, A.L. Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 365-374, 2015.
- SILVA, P.R.F.; FREITAS, T.F.S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, v. 38, p. 843-851, 2008.
- SILVA, I.C.M. Extração do óleo de *Cyperus articulatus* L. var. *articulatus* (priprioca) usando o dióxido de carbono supercrítico. 135 p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Recursos Naturais), UFPA, Belém, 2012.
- SILVA, G.S. Extração do óleo de microalgas para a produção de biodiesel. 101p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química), UFPR, Curitiba, 2013.
- SILVEIRA, A S da. Aproveitamento das Cinzas da Casca de Arroz como Suporte Catalítico Heterogêneo na Síntese do Biodiesel por Reação de Hidroesterificação. 51p. **Dissertação** (Mestrado em Sistemas Agroindustriais). UFCG, Pombal, 2014.
- SOBCZUK, T.M.; CHISTI, Y. Potential fuel oils from the microalgae *Choricystis minor*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 100-108, 2010.
- SOLANA, M.; RIZZA, C.S.; BERTUCCO, A. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 311-318, 2014.

- SOUZA, M.E.A.O. Potencial antioxidante de extratos da casca de manga (*Mangifera indica* L. da variedade Tommy Atkins obtidos por métodos a baixa e alta pressão e dimensionamento de uma coluna para extração supercrítica. 191p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimento). UFSC, Florianópolis, 2015.
- SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, M.R.; MENEGHETTI, S.M.P.; WOLF, C.R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise oleoquímica. **Química Nova**, v.30, p. 667-676, 2007.
- SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, p. 768-775, 2009.
- SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H.H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909-941, 2016.
- 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.
- TAPANES, N.C.; ARANDA, D.A.G.; PEREZ, R.D.; CRUZ, Y.R. Biodiesel no Brasil : Matérias-primas e tecnologia de produção. **Acta Scientiae and Technicae**, v. 1, p.199-125, 2013.
- VIÊGAS, C.V.; Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. 90 p. **Dissertação** (Mestrado em Química Tecnológica Ambiental). FURG, Rio Grande, 2010.
- ZIENKIEWICZ, K.; DU, Z.; MA, W.; VOLLHEYDE, K.; BENNING, C. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 1269-1281, 2016.

**APÊNDICE1**

Cromatogramas com o perfil de ácidos graxos dos extratos.

FIGURA A1-1. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL.

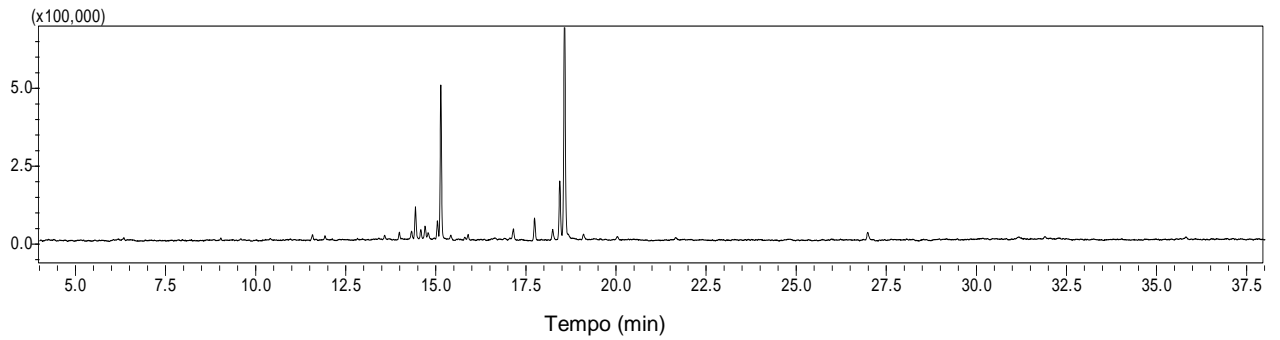


FIGURA A1-2. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO UTILIZANDO HEXANO NA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL..

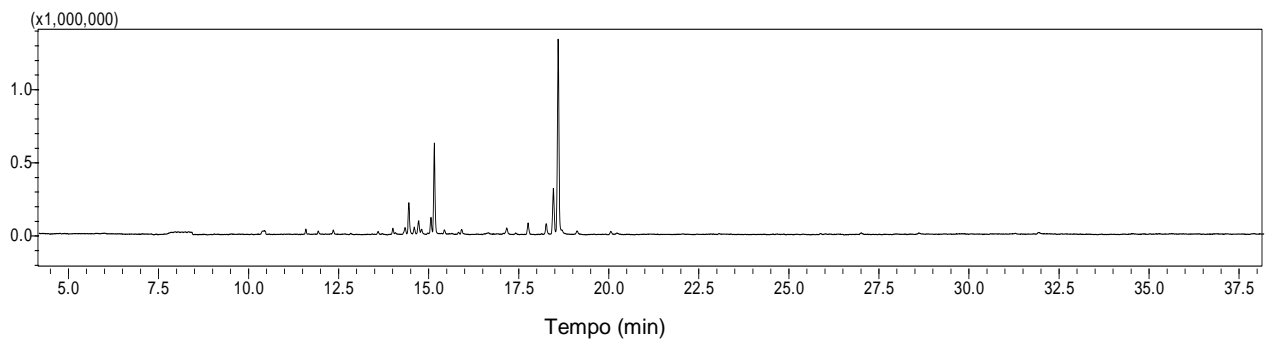


FIGURA A1-3. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO UTILIZANDO CLOROFÓRMIO:METANOL NA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL

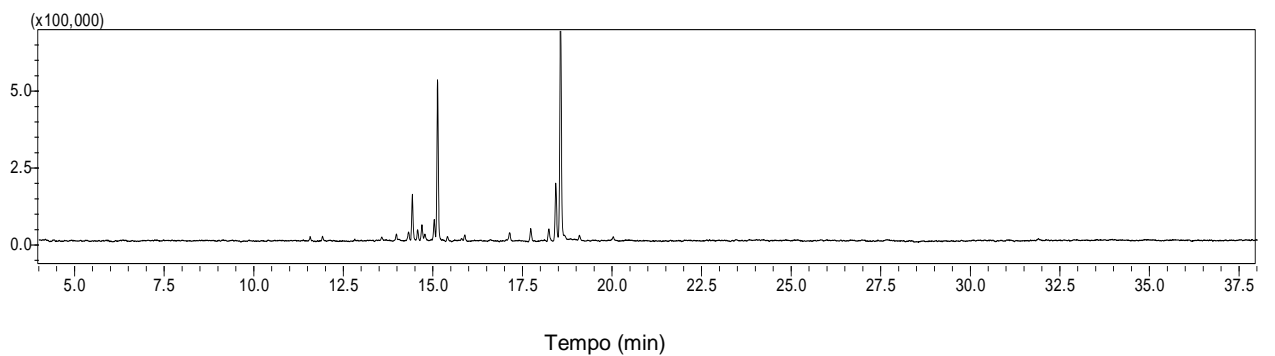


FIGURA A1-4. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO SC-CO<sub>2</sub>E ETANOL A 80 °C E 150 BAR (T3).

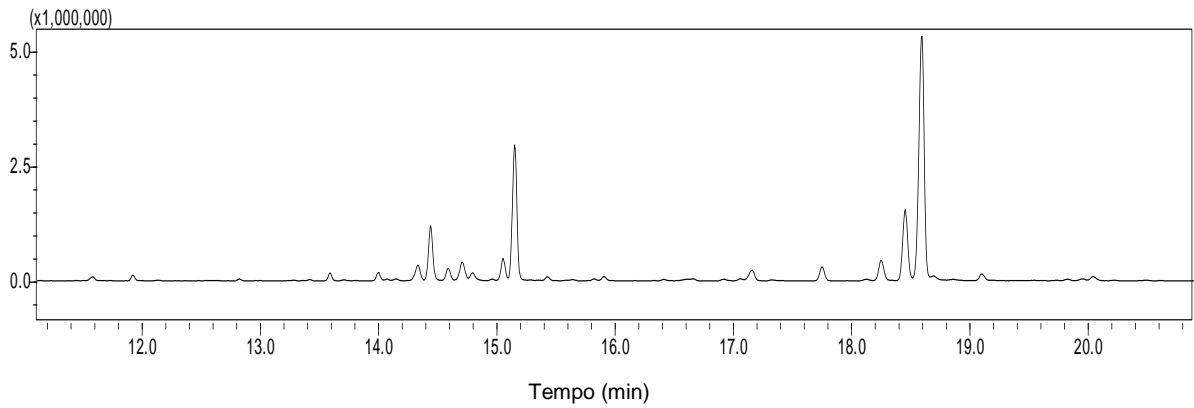


FIGURA A1-5. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO SC-CO<sub>2</sub> E ETANOL A 60 °C E 200 BAR (T9).

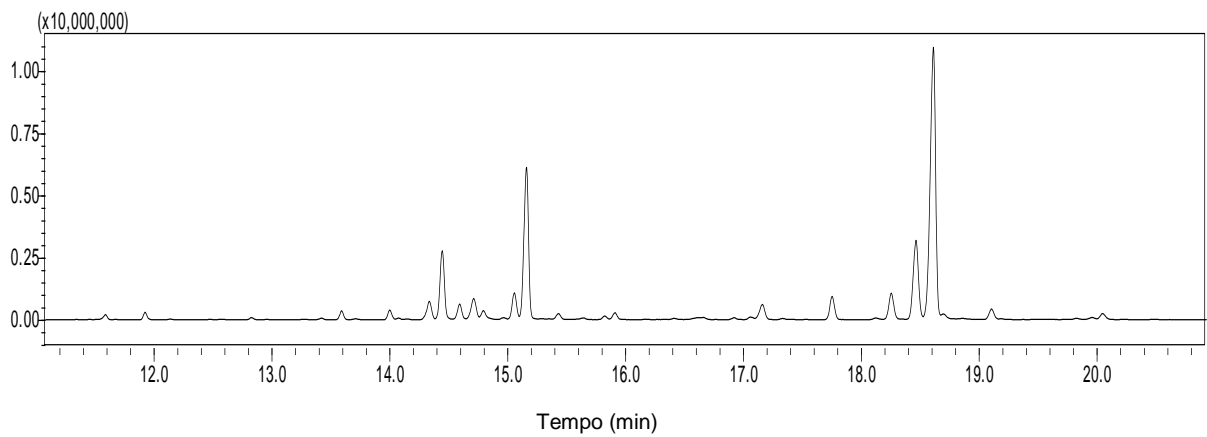


FIGURA A1-6. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO SC-CO<sub>2</sub> A 60 °C E 200 BAR (T12).

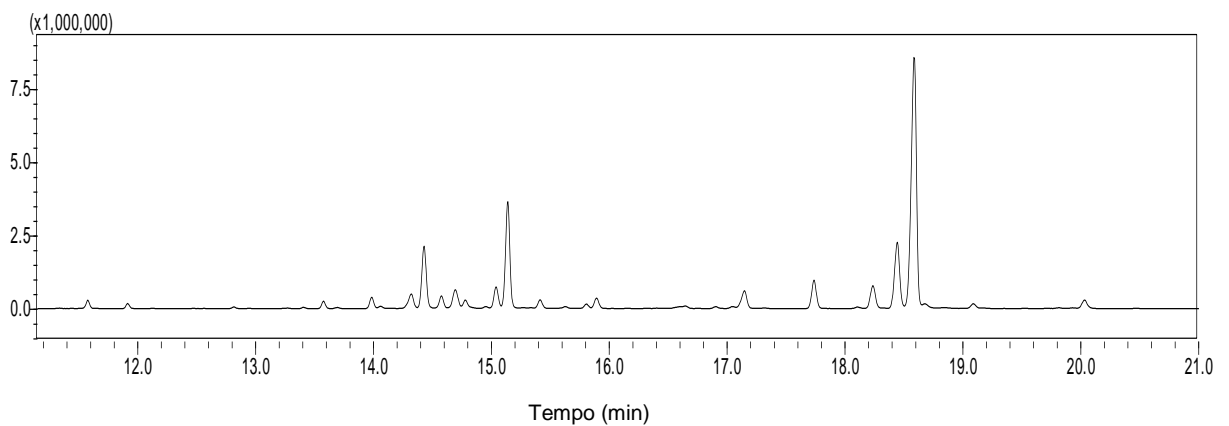


FIGURA A1-7. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO SC-CO<sub>2</sub>E HEXANO A 60 °C E 200 BAR (T28).

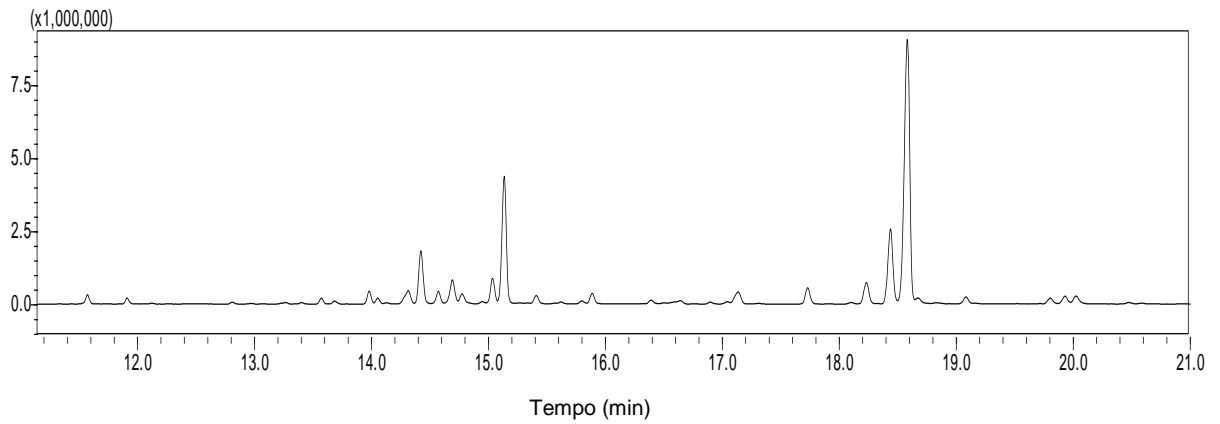


FIGURA A1-8. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO PROPANO E ETANOL A 80 °C E 50 BAR (T18).

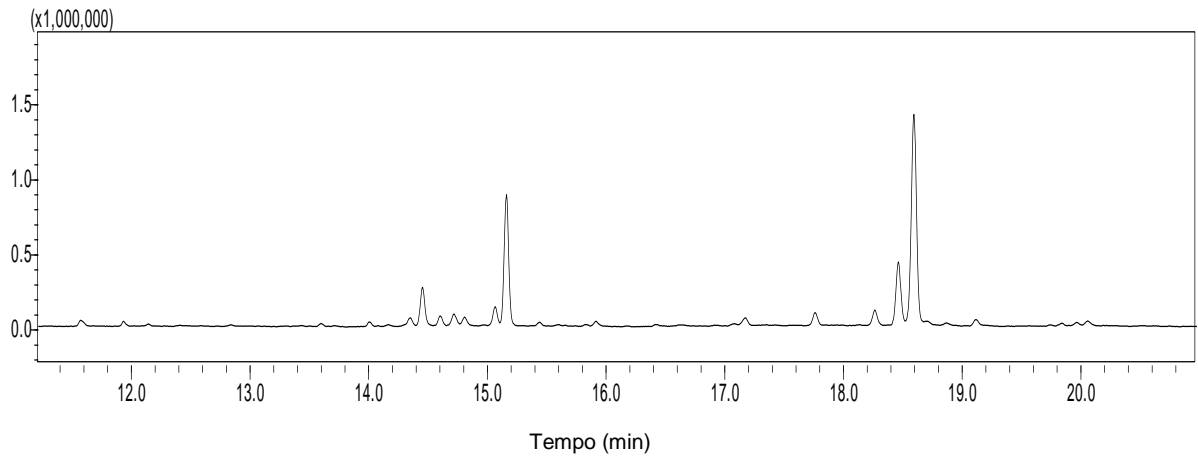


FIGURA A1-9. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO PROPANO A 60 °C E 75 BAR (T23).

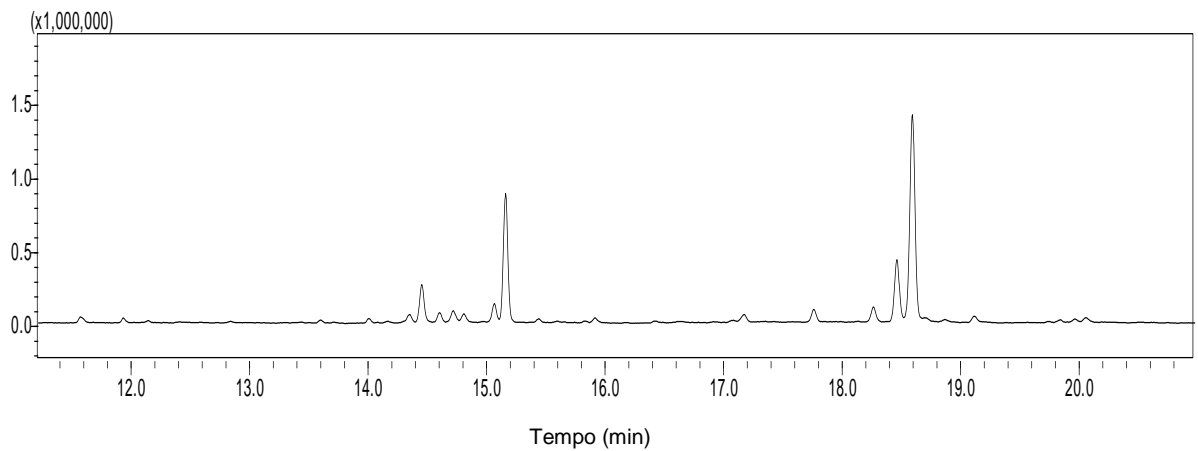


FIGURA A1-10. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO PROPANO E ETANOL A 60 °C E 75 BAR (T24).

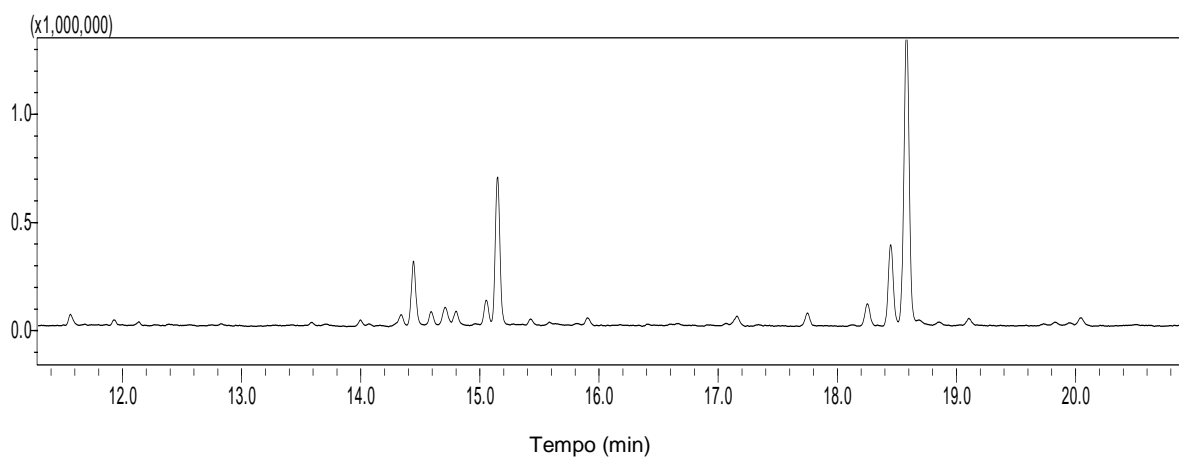


FIGURA A1-11. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO OBTIDO UTILIZANDO PROPANO E HEXANO A 60 °C E 75 BAR (T27).

