

ISABELA NASCIMENTO TAVARES FERREIRA

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* COM ACETATO DE ETILA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcio Arêdes Martins

Coorientadora: Rita de Cássia Superbi de Souza

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

F383o
2021
Ferreira, Isabela Nascimento Tavares, 1996-
Otimização da extração de lipídios da microalga
Scenedesmus obliquus com acetato de etila / Isabela Nascimento
Tavares Ferreira. – Viçosa, MG, 2021.
108 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Marcio Arêdes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 89-99.

1. Microalgas. 2. *Scenedesmus obliquus*. 3. Extração por
solventes. 4. Equilíbrio líquido-líquido. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química. II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

ISABELA NASCIMENTO TAVARES FERREIRA

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* COM ACETATO DE ETILA

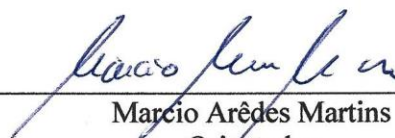
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de maio de 2021.

Assentimento:



Isabela Nascimento Tavares Ferreira
Autora



Marcio Arêdes Martins
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir alcançar mais essa conquista.

A minha mãe, pelo apoio incondicional e por sempre investir e acreditar em mim.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pela oportunidade concedida a mim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Marcio Arêdes pela orientação, confiança e ensinamentos.

À Professora Rita pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais membros da banca examinadora, Dr. Maurício e Professora Jane, por fazerem parte da conclusão de mais essa etapa.

Ao Dilson, Maurício e demais colegas do Laboratório de Biocombustíveis.

A todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

ISABELA NASCIMENTO TAVARES FERREIRA, filha de Manoel Tavares Ferreira e Rosilene Conceição do Nascimento, nasceu em Visconde do Rio Branco, Estado de Minas Gerais, em 07 de agosto de 1996.

Em abril de 2014 iniciou o Curso de Engenharia Química na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre (UFES), graduando-se em fevereiro de 2019.

Em março de 2019, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Processos Industriais, concluindo-o em maio de 2021.

RESUMO

FERREIRA, Isabela Nascimento Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Otimização da extração de lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus* com acetato de etila.** Orientador: Marcio Arêdes Martins. Coorientadora: Rita de Cássia Superbi de Souza.

As microalgas são organismos unicelulares que possuem a capacidade de armazenar lipídios, despertando interesse para a produção de biodiesel motivando o desenvolvimento de inúmeras pesquisas. Para viabilizar a produção de biocombustíveis de microalgas em escala industrial, um dos impasses é o desenvolvimento de uma rota energeticamente eficiente que maximize a extração de óleo da biomassa úmida e sua conversão a biodiesel. Esse estudo teve por objetivo determinar os dados de equilíbrio do sistema de extração de lipídios de *Scenedesmus obliquus* BR003, composto por um óleo modelo (homólogo ao da microalga), acetato de etila e água. A seletividade da extração do óleo de microalgas foi calculada a partir dos valores de coeficiente de partição para ácidos graxos livres (AGL) e para lipídios neutros (LN), que foram obtidos nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C e nos teores de acidez de 2, 20 e 40 % AGL. O estudo de otimização foi realizado visando à seleção da condição operacional na qual fosse obtido o maior rendimento em óleo extraído, utilizando de forma conjunta os valores de coeficiente de partição, número de estágios de extração em batelada, volumes relativos das fases extrato e refinado e menor o consumo de energia empregada para recuperação dos solventes. A comparação do desempenho da extração de óleo da biomassa úmida (suspensão aquosa com 10 % de sólidos) foi realizada com as misturas solventes clorofórmio: metanol (1:2 v/v) e hexano: etanol (1:1 v/v). A temperatura da extração e a acidez do óleo influenciam a equilíbrio de fases e, conseqüentemente, a curva binodal. Os valores de seletividade indicaram que o uso do acetato de etila como solvente favoreceu a concentração de AGL e dos lipídios neutros (LN) na fase rica em acetato de etila (superior). O aumento da acidez inicial do óleo diminuiu o coeficiente de partição dos lipídios neutros e aumentou a seletividade. Os valores de seletividade nos sistemas contendo óleo bruto de *S. obliquus* apresentaram valores inferiores aos do óleo modelo, em decorrência da diminuição dos coeficientes de partição do AGL e do lipídio neutro nesses sistemas, comportamento justificado pela complexidade da composição do óleo de microalgas. Em relação ao estudo de otimização, verificou-se que 1 h de extração é suficiente para atingir o equilíbrio de fases e sua separação por solubilidade. Resultados do teste de carga e de temperatura indicaram que

25 °C e razão acetato de etila: suspensão aquosa com 1 % (m/m) de óleo igual a 1:10 em volume são as condições mais favoráveis a extração. O desempenho da extração de óleo da microalga com acetato de etila foi comparado com misturas de solventes clorofórmio: metanol (2:1 v/v), que resultou em maior rendimento já no primeiro estágio, enquanto que o acetato de etila e hexano: etanol (1:1 v/v) resultaram no mesmo rendimento acumulado em dois estágios de extração. Uma análise comparativa de um processo de extração de óleo da biomassa em dois estágios foi realizada para o acetato de etila e as misturas de clorofórmio: metanol e hexano:etanol, considerando a recuperação dos solventes com afinidade pela fase aquosa (refinado), como etanol e metanol. Por meio dos resultados dos balanços de massa e energia, verificou-se que o consumo de energia é fortemente dependente da recuperação dos solventes polares na fase aquosa, o que viabiliza o uso do acetato de etila, que não requer recuperação devido à sua baixa solubilidade em água. Adicionalmente, destaca-se que o uso do acetato de etila confere um caráter sustentável ao processo de extração e óleo, visto que não se utiliza solventes tóxicos e não renováveis, como metanol, hexano e clorofórmio.

Palavras-chave: Microalgas. *Scenedesmus obliquus*. Extração líquido-líquido. Dados de Equilíbrio. Otimização.

ABSTRACT

FERREIRA, Isabela Nascimento Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2021. **Optimization of lipid extraction of microalgae *Scenedesmus obliquus* with ethyl acetate.** Adviser: Marcio Arêdes Martins. Co-adviser: Rita de Cássia Superbi de Souza.

Microalgae are single-celled organisms that have the ability to store lipids, arousing interest for biodiesel production, motivating the development of numerous researches. To enable the production of microalgae biofuels on an industrial scale, one of the impasses is the development of an energy-efficient route that maximizes the extraction of oil from wet biomass and its conversion to biodiesel. This study aimed to determine the equilibrium data of the lipid extraction system of *Scenedesmus obliquus* BR003, composed of a model oil (homologue to microalgae), ethyl acetate and water. The selectivity of microalgae oil extraction was calculated from the values of partition coefficient for free fatty acids (FFA) and neutral lipids (NL), which were obtained at temperatures of 25, 35 and 45 °C and at the acidity contents of 2, 20 and 40 % AGL.

The optimization study was carried out aiming at the selection of the operational condition in which the highest yield in extracted oil was obtained, using jointly the values of partition coefficient, number of batch extraction stages, relative volumes of extract and rafinado phases and lower energy consumption used for solvent recovery. The comparison of the oil extraction performance of wet biomass (aqueous suspension with 10 % solids) was performed with the chloroform solvent mixtures: methanol (1:2 v/v) and hexane: ethanol (1:1 v/v). The extraction temperature and acidity of the oil influence the equilibrium of phases and, consequently, the binodal curve. Selectivity values indicated that the use of ethyl acetate as a solvent favored the concentration of FFA and neutral lipids (NL) in the phase rich in ethyl acetate (superior). The increase in the initial acidity of the oil decreased the partition coefficient of neutral lipids and increased selectivity. The selectivity values in the systems containing crude oil of *S. obliquus* presented values lower than those of the model oil, due to the decrease in the partition coefficients of the FFA and the neutral lipid in these systems, behavior justified by the complexity of the composition of microalgae oil. In relation to the optimization study, it was found that 1 h of extraction is sufficient to achieve the equilibrium of phases and their separation by solubility. Load and temperature test results indicated that 25 °C and ethyl acetate ratio: aqueous suspension with 1 % (m/m) of oil equal to 1:10 in

volume are the most favorable conditions for extraction. The performance of the extraction of oil from the microalgae with ethyl acetate was compared with mixtures of chloroform solvents: methanol (2:1 v/v), which resulted in higher yield already in the first stage, while ethyl acetate and hexane: ethanol (1:1 v/v) resulted in the same yield accumulated in two stages of extraction. A comparative analysis of a two-stage biomass oil extraction process was performed for ethyl acetate and chloroform mixtures: methanol and hexane:ethanol, considering the recovery of solvents with affinity for the aqueous phase (raffinate), such as ethanol and methanol. Through the results of mass and energy balances, it was found that energy consumption is strongly dependent on the recovery of polar solvents in the aqueous phase, which enables the use of ethyl acetate, which does not require recovery due to its low solubility in water. Additionally, it is noteworthy that the use of ethyl acetate gives a sustainable character to the extraction process and oil, since toxic and non-renewable solvents such as methanol, hexane and chloroform are not used.

Keywords: Microalgae. *Scenedesmus obliquus*. Liquid-liquid extraction. Equilibrium Diagrams. Optimization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** (A) Transesterificação de um triglicerídeo e (B) reação de esterificação de ácidos graxos. 25
- Figura 1.2:** Óleo extraído das microalgas (A) *Desmodemus communis* BR007, (B) *Chlorella pyrenoidosa* e (C) *Scenedesmus obliquus* BR003. 32
- Figura 3.1:** Diagrama de mistura ternária óleo modelo (40% AGL) + acetato de etila + água a 25°C. 45
- Figura 3.2:** Ilustração da metodologia de titulação turbidimetria a 25 °C: (A) óleo a 2 % AGL límpido, (B) após a primeira adição de água, e (C) a mistura óleo, água e acetato de etila antes e (D) após a separação das fases. 46
- Figura 3.3:** (A) Qualidade de ajuste, (B) identidade e (C) resíduos dos modelos para 40% AGL e 25 °C. 53
- Figura 3.4:** Influência do teor de temperatura no comportamento das curvas binodais (A) 2 % AGL, (B) 20 % AGL e (C) 40 % AGL, em que w_1 é a fração mássica do óleo modelo e w_2 a fração mássica do acetato de etila. 54
- Figura 3.5:** Influência do teor de acidez no comportamento das curvas binodais (A) 25 °C, (B) 35 °C e (C) 45 °C, em que w_1 é a fração mássica do óleo modelo e w_2 a fração mássica do acetato de etila. 55
- Figura 3.6:** Comparação das respostas considerando os três teores de AGL e as três temperaturas estudadas, em que w_1 é a fração mássica do óleo modelo e w_2 é a fração mássica do acetato de etila. 56
- Figura 3.7:** Curvas binodais e linhas de amarração para o sistema contendo teores de AGL de (A) 2 %, (B) 20 e (C) 40 % a 25 °C em coordenadas triangulares. 59
- Figura 3.8:** Curvas binodais e linhas de amarração para o sistema contendo teores de AGL de 2 % (A), 20 % (B) e 40 % (C) a 35 °C em coordenadas triangulares. 60
- Figura 3.9:** Curvas binodais e linhas de amarração para o sistema contendo teores de AGL de 2 % (A), 20 % (B) e 40 % (C) a 45 °C em coordenadas triangulares. 61
- Figura 4.1:** Separação de fases do sistema contendo acetato de etila e suspensão aquosa com 1% (m/m) de óleo modelo a 40% AGL nas proporções em volume de (A) 1:2; (B) 1:4; (C) 1:10. 71
- Figura 4.2:** Separação de fases na extração do óleo modelo a 40% AGL com carga de solvente: suspensão aquosa a 1% de óleo (m/m) de 1:10 (v/v) com (A) acetato de etila (B) hexano: etanol (1:1 v/v) e (C) clorofórmio: metanol (1:2 v/v). 72
- Figura 4.3:** Separação de fases na extração do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 com carga de solvente: suspensão aquosa a 1% de óleo (m/m) de 1:10 (v/v) com (A) acetato de etila (B) hexano: etanol (1:1 v/v) e (C) clorofórmio: metanol (1:2 v/v). 73
- Figura 4.4:** Resultados obtidos pelo teste de carga com acetato de etila e suspensão aquosa de 1% de óleo nas proporções de 1:2, 1:4 e 1:10 (v/v) nas temperaturas de (A) 25, (B) 35 e (C) 45°C. 78
- Figura 4.5:** Efeito dos solventes e número de estágios do desempenho da extração do (A) óleo modelo e (B) óleo de *Scenedesmus obliquus* dispersos em água a 1% (m/m). 80

Figura 4.6: Placa de sílica resultante da cromatográfica em camada delgada. 1= Padrão, 2=Óleo bruto da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, 3=Óleo modelo a 2 % AGL, 4=Óleo modelo a 20 % AGL, 5=Óleo modelo a 40 % AGL e 6=AGL. LP = Lipídios polares; PIG = Pigmentos; MAG e DAG = Mono e diacilglicerol; AGL = Ácidos graxos livres; TAG = Triacilglicerol.81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Comparação entre os cultivos em sistema fechado e aberto	22
Tabela 1.2: Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.....	23
Tabela 1.3: Comparação de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel.....	24
Tabela 2.1: Teores de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas para a biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003	37
Tabela 3.1: Composição de ácidos graxos de óleos utilizados no óleo modelo e do óleo bruto de <i>Scenedesmus obliquus</i>	50
Tabela 3.2: Valores dos parâmetros da equação 1 do sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) a 25, 35 e 45 °C.....	51
Tabela 3.3: Valores dos parâmetros da equação 2 do sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) a 25, 35 e 45°C.....	51
Tabela 3.4: Valores dos parâmetros da equação 3 do sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) a 25, 35 e 45°C.....	52
Tabela 3.5: Valores dos parâmetros da equação 1, 2 e 3 do sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) a 25, 35 e 45°C.....	52
Tabela 3.6: Dados das linhas de amarração para o sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) com 2 % AGL a 25, 35 e 45 °C.....	57
Tabela 3.7: Dados das linhas de amarração para o sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) com 20 % AGL a 25, 35 e 45 °C.....	57
Tabela 3.8: Dados das linhas de amarração para o sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) com 40 % AGL a 25, 35 e 45 °C.....	58
Tabela 3.9: Parâmetros de ajuste obtidos por Othmer-Tobias (equação 9) e Bancroft (equação 10) para o sistema óleo modelo (TAG + AGL) (1) + acetato de etila (2) + água (3) com 2, 20 e 40 % AGL a 25, 35 e 45 °C.....	59
Tabela 3.10: Valores dos coeficientes de partição de lipídios neutros (K_{ln}), AGL (K_{agl}), seletividade (S) e eficiência de extração (EE) para os sistemas com teores de AGL de 2 %, 20 % e 40 % nas temperaturas 25 °C, 35 °C e 45 °C.	62
Tabela 4.1: Valores de hexano e acetato de etila empregados nos ensaios preliminares.....	69
Tabela 4.2: Teor de lipídios encontrados nos ensaios de seleção de solventes e tipo de rompimento (RA – ácido, RM - mecânico). letras iguais para uma mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste tukey a um nível 5 % de significância.	75
Tabela 4.3: Massa de óleo modelo extraída em diferentes tempos de agitação em tamboramento rotativo. letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste tukey a um nível 5 % de significância.....	77
Tabela 4.4: Rendimento de extração acumulado em função de diferentes cargas de acetato de etila e suspensão aquosa de 1% de óleo e temperaturas.....	79
Tabela 4.5: Rendimento de extração acumulado em função dos solventes e número de estágios e suspensão aquosa de 1% de óleo modelo e de óleo de <i>Scenedesmus obliquus</i>	80

Tabela 4.6: Coeficiente de partição de AGL, LN e seletividade para o óleo modelo com 40% agl e o da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> com acetato de etila, clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e hexano: etanol (1:1 v/v) a 25 °C.....	82
Tabela 4.7: Rendimento acumulado de óleo extraído da biomassa úmida. AE= acetato de etila; C:M= clorofórmio: metanol (1:2 v/v) e H:E= hexano: etanol (1:1 v/v).....	83
Tabela 4.8: Propriedades físicas	86
Tabela 4.9: Resultados balanço de massa e energia.	87
Tabela 4.10: Custos referentes à compra de solventes e energia gasta para recuperar e não recuperar o acetato de etila, metanol e etanol.....	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1 Microalgas.....	21
1.2 Biodiesel de microalgas.....	23
1.3 Extração líquido-líquido.....	26
1.4 Dados de equilíbrio.....	30
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> BR003.....	33
RESUMO.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 Matéria prima.....	34
2.2 Caracterização físico-química da biomassa liofilizada.....	35
2.2.1 Teores de água, cinzas e biomassa livre de cinzas.....	35
2.2.2 Teor de lipídios totais.....	35
2.2.3 Teor de carboidratos totais.....	36
2.2.4 Teor de proteína total.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
3.1 Teores de água, cinzas e biomassa livre de cinzas.....	36
3.2 Teor de lipídios.....	38
3.3 Teor de carboidratos.....	38
3.4 Teor de proteínas.....	39
CONCLUSÃO.....	39
CAPÍTULO 3 - DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA O SISTEMA ÓLEO MODELO, ACETATO DE ETILA E ÁGUA.....	41
RESUMO.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Materiais.....	43
2.2 Preparo do óleo modelo.....	44

2.3 Preparo do ácido graxo livre.....	44
2.4 Mapeamento do sistema ternário.....	44
2.5 Determinação da curva binodal.....	45
2.6 Determinação das linhas de amarração.....	46
2.7 Determinação da eficiência de extração.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
3.1 Caracterização do óleo bruto da microalga <i>scenedesmus obliquus</i>	49
3.2 Preparo do óleo modelo.....	50
3.3 Curva binodal.....	50
3.4 Linhas de amarração.....	56
3.5 Determinação dos coeficientes de partição e seletividade.....	61
CONCLUSÃO.....	64
CAPÍTULO 4 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DA BIOMASSA ÚMIDA DA MICROALGA <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> COM ACETATO DE ETILA.....	65
RESUMO.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
2.1 Materiais.....	68
2.2 Seleção de solventes.....	68
2.3 Preparo do óleo para estudo.....	69
2.4 Determinação do tempo de extração.....	70
2.5 Teste de carga.....	70
2.6 Análise estatística.....	71
2.7 Ensaio de validação.....	72
2.8 Ensaio com biomassa úmida.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	75
3.1 Seleção de técnicas de rompimento celular para a extração de lipídios.....	75
3.2 Teste de carga e avaliação do tempo de extração.....	77
3.3 Teste de carga.....	77
3.4 Ensaio de validação.....	79
3.5 Efeito dos componentes celulares da biomassa de microalgas e técnicas de rompimento celular no desempenho da extração.....	83
3.5.1 Balanço de massa para sistema biomassa úmida + acetato de etila.....	84
3.5.2 Balanço de massa para sistema biomassa úmida + clorofórmio + metanol.....	84
3.5.3 Balanço de massa para sistema biomassa úmida + hexano + etanol.....	85

3.6 Balanço de energia.....	86
CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS	100
APÊNDICE B – DADOS MAPEAMENTO DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO	103
APÊNDICE C– DADOS DAS CURVAS BINODAIS.....	105
APÊNDICE D– ANÁLISE DE IDENTIDADE.....	108

1 INTRODUÇÃO

O constante aumento no preço dos combustíveis atrelado a preocupação com os impactos ambientais provenientes das emissões gasosas têm motivado a busca de fontes renováveis e tecnologias sustentáveis que satisfaçam às necessidades da indústria e do mercado. A dependência do petróleo, recurso finito e, portanto, não renovável, tem motivado a busca por matérias-primas renováveis para a produção de biocombustíveis. É importante ressaltar que a expectativa, segundo alguns pesquisadores, é de que o petróleo deve acabar por volta de 2070 (SILVA; BACHOLSKY; JERÔNIMO, 2015).

Dentre as fontes renováveis potenciais, as microalgas têm ganhado papel de destaque nos últimos anos como matéria-prima para a produção de biodiesel. Esses microrganismos apresentam grande capacidade para produzirem biomassa por unidade de área e em curto tempo, quando comparadas às outras fontes renováveis que comumente são empregadas para a produção de biodiesel, como a soja, o algodão e gado de corte. Outra vantagem é o fato de não apresentarem sazonalidade (período de safra) e não dependerem de condições específicas do solo. Além disso, algumas espécies de microalgas têm a capacidade de armazenar grande quantidade de óleo (SILVA; BACHOLSKY; JERÔNIMO, 2015; AGÊNCIA BRASIL, 2019).

Cultivos em grande escala de uma única linhagem de microalgas são de difícil realização, uma vez que pode acontecer contaminação por outros microrganismos nos sistemas abertos. Por outro lado, cultivos em sistemas fechados são passíveis de aquecimento excessivo pela incidência de radiação solar, sendo, portanto, um sistema de maior custo operacional (YIN et al., 2020). A viabilidade da produção de biodiesel a partir das microalgas não depende apenas do custo associado ao cultivo, mas também das técnicas de extração e refino do óleo. Após a colheita, as microalgas contêm elevado teor de água (mais de 70 %), sendo, portanto, difícil para solventes orgânicos apolares, como o hexano, penetrarem na barreira da água para extrair lipídios intracelulares. Para superar esse problema, o processo de extração de lipídios é composto por duas etapas: pré-tratamento, para rompimento das células, e recuperação de lipídios usando solventes orgânicos. Vale ressaltar que, embora o processo de secagem acarrete em um maior rendimento de extração, consome muita energia e resulta em um balanço de energia deficiente (KWAK *et al.*, 2019).

Chew et al. (2017), Moreno-Garcia et al. (2017) e Roux, Lamotte e Achard (2017) sugerem a utilização da biomassa úmida para extração de lipídios e demais compostos da microalga que possuam alto valor agregado e que podem ser sensíveis à elevação da

temperatura. É importante destacar que ao extrair compostos dispersos e também solubilizados em fase aquosa, o solvente escolhido deve formar fase e conseguir se solubilizar parcialmente na fase aquosa para liberar os lipídios solvatados.

Um dos métodos empregados para a extração de lipídios da biomassa úmida é a extração líquido-líquido, que se refere a uma operação unitária de separação de componentes que apresentem diferença de solubilidade nas duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis que compõem o sistema. A separação ocorre devido ao contato com um solvente insolúvel que irá dissolver, de forma preferencial, um ou mais componentes da mistura e depende da diferença da distribuição dos componentes entre as fases. Dessa forma, se faz necessário um estudo sobre os solventes a serem empregados para uma extração mais efetiva. Uma fase será representada pela solução de alimentação, enquanto a outra será o solvente de extração a ser empregado. A transferência de massa do soluto líquido ocorre da solução de alimentação para a fase solvente (FRANK et al., 2008).

As primeiras pesquisas com microalgas para produção de biodiesel foram realizadas por meio do Programa de Espécies Aquáticas (ASP) que foi financiado pelo Escritório de Desenvolvimento de Combustíveis de Energia norte-americano, de 1978 a 1996, cujo objetivo foi de encontrar novas espécies de microalgas, definir estratégias de produção utilizando sistemas de cultivos abertos e fechados em fotobiorreatores e estudar a produção de biodiesel a partir de microalgas. A partir desses estudos, houve um grande desenvolvimento na manipulação do metabolismo de microalgas e na engenharia de sistemas de produção das mesmas. Entretanto, a conclusão do estudo apontou para um processo inviável, porque os custos para utilizar a microalga como matéria-prima naquela época eram mais altos do que os que empregavam combustíveis fósseis. (FRANCO et al., 2013).

O programa RITE (*Research Institute of Innovative Technology for the Earth*), desenvolvido nos anos 90 no Japão, teve objetivo semelhante ao ASP, mas com o cultivo realizado apenas em fotobiorreatores, no qual é possível se ter um maior controle e uma maior produtividade de biomassa por área quando comparado ao sistema aberto. Nesse programa também se apontou que os processos de produção eram inviáveis para biocombustíveis (FRANCO et al., 2013).

Como no ASP e no RITE não foi possível a obtenção do biodiesel a partir das microalgas, inúmeras pesquisas continuam sendo realizadas objetivando definir condições de extração do óleo e rotas para a produção de biodiesel. Como exemplo, Chang et al. (2020) investigaram a produção de biodiesel a partir da biomassa úmida da microalga *Chlorella*

vulgaris. O processo de extração do óleo e de transesterificação *in situ* das células foi realizado sem a presença de um catalisador e com o emprego de metanol misturado ao óleo de mamona contendo CO₂ pressurizado. Nesse estudo, realizou-se um delineamento experimental, no qual o óleo da mamona mostrou que não era apenas um co-solvente, mas um precursor do biodiesel e que poderia reduzir ainda mais a pressão e o tempo de extração. Os autores encontraram como melhor condição operacional a que empregava uma quantidade de microalga igual a 10 g contendo 20 % em massa de água, uma proporção de metanol / biomassa de 1,5 (g / g), uma quantidade de óleo de mamona de 4,5 g, uma temperatura de 220 °C, uma pressão de 9,7 MPa e um tempo de 30 min, os rendimentos de biodiesel do óleo da microalga e óleo de mamona foram de 61,4 % e 63,3 %, respectivamente.

No Brasil, a estimativa é que mais de R\$ 26 milhões tenham sido investidos em pesquisa e desenvolvimento para a produção de biodiesel a partir das microalgas. Esse investimento, embora modesto quando comparado aos investimentos internacionais, permitiu o desenvolvimento de novas técnicas de cultivos, metodologias para maximizar a produção de óleo e a avaliação de processos que sejam mais econômicos e eficientes para a coleta da biomassa de algas e para a extração da fração lipídica (FRANCO et al., 2013; ECODEBATE, 2015).

O biodiesel é definido como combustível formado pela mistura de monoalquil éster de cadeias longas, oriundos de óleos vegetais ou de gorduras de animais, que é misturado ao óleo diesel derivado do petróleo. Vale ressaltar que diferentes proporções dos componentes na mistura podem ser empregadas. Em 2019, o Brasil produziu 6,4 bilhões de litros de biodiesel, o que representa cerca de 8,5 % do que foi produzido pelas usinas brasileiras em 2020 (TNPETRÓLEO, 2020). Além disso, em março de 2021, aumentou-se na mistura de biodiesel no diesel, de 12 % para 13 % (PELEGI, 2021).

Para produzir o biodiesel normalmente utiliza-se a reação de transesterificação, que consiste em uma reação entre o óleo e um álcool (geralmente etanol ou metanol) na presença de um catalisador e sob aquecimento. Outro processo que pode ser empregado é o craqueamento, no qual a matéria prima é submetida a altas temperaturas, com ou sem a presença de catalizadores. Essas condições de craqueamento permitem a quebra de triacilglicerídio em moléculas menores, que por destilação obtém-se uma fração equivalente ao diesel de petróleo, geralmente denominada de diesel vegetal (MA e HANNA, 1999; ROBLES-MEDINA et al., 2009).

Para a obtenção do biodiesel de origem vegetal, o óleo de inúmeras matérias-primas como a soja, o girassol, a mamona pode ser utilizado, assim como o óleo de fritura residual (AGÊNCIA BRASIL, 2019). Para obtenção de óleos dessas diferentes matérias primas é necessário utilizar técnicas de extração. Na extração líquido-líquido, os dados de seletividade e coeficiente de partição, obtidos a partir dos dados de equilíbrio, permitem inferir sobre o desempenho do sistema de extração quanto ao rendimento em lipídios e número de estágios requeridos. No entanto, a análise de viabilidade depende de outros fatores, como tempo de extração, volumes relativos das fases e consumo de energia utilizada não somente na extração, mas, sobretudo na recuperação dos solventes e concentração do produto de interesse, ou seja, os lipídios.

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo a obtenção de dados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema óleo + água deionizada + acetato de etila e a otimização de condições de extração de lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus* de forma a obter-se rendimento em óleo elevado e com menor consumo de insumos e de energia possível. Especificamente, objetiva-se minimizar: o número de estágios de extração, o volume relativo entre solvente e biomassa, e a demanda por energia na concentração dos lipídios e na recuperação dos solventes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a extração de lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 com acetato de etila visando a consolidação de um processo com menor consumo de insumos e energia possível.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar a biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003 quanto aos teores de água, cinzas, lipídios, carboidratos e proteínas.
2. Caracterizar o óleo extraído da microalga e definir um óleo modelo homólogo e translúcido, a fim de possibilitar o acesso ótico à mistura, para a realização de ensaios de titulação turbidimétrica para obtenção de dados de equilíbrio.
3. Caracterizar o sistema bifásico por meio da obtenção dos dados de equilíbrio do sistema ternário óleo (modelo), acetato de etila e água nas temperaturas 25 °C, 35 °C e 45 °C, e com teores de acidez de 2%, 20% e 40%.
4. Determinar o coeficiente de partição para o ácido graxo livre e lipídios neutros, o que permitirá avaliar a seletividade da extração dos lipídios em cada temperatura.
5. Definir a condição operacional que resulta em maior rendimento em óleo extraídos, menor número de estágios de extração, menor quantidade de solvente a ser utilizado e a menor quantidade de energia para a recuperação do óleo e reuso do solvente.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Microalgas

As algas são organismos fotossintetizantes que proporcionam fonte de carbono e energia para outros organismos. Essas são classificadas como macroalgas, que são as algas marinhas, e como microalgas, que são organismos unicelulares (SIRAKOV et al., 2015). Essas últimas são microrganismos aquáticos que apresentam características estruturais e morfológicas que as diferenciam entre si, mas são semelhantes quanto à fisiologia e apresentam um metabolismo parecido ao das plantas vasculares (DERNER et al., 2006; BARCELLOS et al., 2012).

Além disso, as microalgas são fonte de diversas substâncias de valor comercial e podem ser empregados para a produção dos mais diversos produtos como suplementos alimentares, fármacos, pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, proteínas e sais minerais e biocombustíveis (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

Uma das formas de cultivo da microalga é em sistemas abertos que são assim denominados pela cultura estar em contato com o ambiente externo. Esses sistemas são caracterizados pela ausência de controle automático de pH, luz e temperatura, o que faz com que sejam de baixo custo e de fácil operação. Entretanto, é importante o controle adequado de fatores físico-químicos como intensidade da luz e temperatura, assim como de fatores biológicos que podem influenciar o desenvolvimento da microalga, pois, dessa forma, a produtividade volumétrica pode ser alta, já que a utilização da luz pode ser eficiente e não há a possibilidade das microalgas serem contaminadas por outros organismos (DERNER et al., 2006; BARCELLOS et al., 2012).

Já os sistemas de cultivo em tanques fechados são denominados de fotobioreatores (PBR). Neste tipo de sistema, a cultura não tem contato com o ambiente e existe um controle automático das condições de cultivo, como concentração de nutrientes, pH e luz. Como vantagens dessa forma de cultivo tem-se a possibilidade de obtenção de uma elevada produtividade volumétrica, o controle das vazões de ar e água, da dissolução dos gases, a redução da vulnerabilidade a contaminações e a utilização eficiente dos nutrientes do meio de cultura (DERNER et al., 2006). A Tabela 1.1 resume as principais diferenças entre os sistemas aberto e fechado.

Tabela 1.1: Comparação entre os cultivos em sistema fechado e aberto.

Parâmetro	Sistema Fechado	Sistema Aberto
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Regime de operação	Contínuo	Lote ou semi-contínuo
Relação área/volume	Alta (20-200 m ² m ⁻³)	Baixo (5-10 m ² m ⁻³)
Densidade celular	Alto	Baixo
Controle do processo	Fácil	Difícil
Investimento	Alto	Baixo
Custos de operação	Alto	Baixo
Aumento da escala	Difícil	Fácil
Eficiência de utilização da luz	Alta	Baixa

Fonte: Campo, García-González e Guerrero (2007).

Muitos investimentos em cultivo de microalgas e em pesquisas têm sido realizados pelo seu elevado potencial para a produção de biocombustíveis, em especial as de teor de lipídio mais elevado (Tabela 1.2). É possível observar que os teores de lipídio variam de acordo com a espécie de microalga. Além disso, é importante ressaltar que a forma de cultivo e as condições a serem empregadas (temperatura, taxa de aeração da mistura e intensidade luminosa, por exemplo) irão influenciar tanto no teor de lipídio quanto nas características do biodiesel produzido (WILLIAMS e LAURENS, 2010; SAN PEDRO et al., 2013).

Os lipídios são um amplo grupo de compostos quimicamente diversos que são solúveis em solventes orgânicos. Em geral, os alimentos lipídicos são indicados como gorduras (sólidos) ou óleos (líquidos), correspondendo a seu estado físico a uma temperatura ambiente (PARKIN; FENNEMA; CLADERA-OLIVERA, 2010). Gorduras e óleos comestíveis são misturas complexas que contêm uma ampla gama de compostos. Eles são compostos principalmente de triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), ácidos graxos livres (AGL), fosfolipídios e outros componentes menores. Qualquer um dos componentes contribui para a textura e o sabor das gorduras e óleos naturais. No entanto, o grupo mais importante de compostos é representado pelos TAG, que são, em termos químicos, álcoois triídricos esterificados com ácidos graxos. (BUCHGRABER *et al.*, 2004).

Os lipídios são classificados como de reserva ou estruturais (polares). Os primeiros são encontrados, em sua maioria, na forma de triacilgliceróis (TAG) que é constituído por ácidos graxos saturados e monoinsaturados, e que podem ser transesterificados para a

produção de biodiesel. Vale ressaltar que há outros lipídios neutros que não possuem ácidos graxos o que impossibilita a conversão a biodiesel, mesmo sendo solúveis em compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos (carotenóides e clorofilas) (HALIM, DANQUAH e WEBLEY, 2012; SHARMA, SCHUHMANN e SCHENK, 2012). Já os lipídios estruturais ou polares, que são nutrientes importantes para seres humanos e animais aquáticos, são compostos por fosfolipídios, glicolipídios e esteróis, que agem como uma barreira de permeabilidade seletiva para células e organelas. (SHARMA, SCHUHMANN e SCHENK 2012).

Tabela 1.2: Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.

Microalga	Teor de lipídios (% massa seca)
<i>Achnanthes sp.</i>	44,5
<i>Amphora sp.</i>	21
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	29-49
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Chlorococcum sp.</i>	19
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella salina</i>	07-25
<i>Ellipsoidium sp.</i>	27
<i>Hormidium sp.</i>	38
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monoraphidium sp.</i>	20
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Nannocloris sp.</i>	20-35
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaedactylum sp.</i>	20-30
<i>Scenedesmus sp.</i>	20-21
<i>Schizodhatrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sp.</i>	12-23

Fonte: Sati et al. (2019).

1.2 Biodiesel de microalgas

As microalgas vêm sendo, cada vez mais, estudadas como matérias-primas para a produção de biocombustíveis. Essa constatação é consequência de inúmeras vantagens quando comparadas com outras fontes de lipídios como: não competem com a produção de alimentos, utilizam solos que são considerados inférteis para a agricultura, necessitam de uma pequena área para serem produzidas e produzem uma produtividade em óleo superior a das

plantas oleaginosas (Tabela 1.3) (SILVA; BACHOLSKY; JERÔNIMO, 2015). Além disso, a eficiência de conversão de óleo de diferentes matérias-primas em biodiesel é: microalgas (91 %); palma (3 %); coco (1,5 %); abacate (1,4 %); pinhão manso (1,2 %); canola (1 %) (YIN et al., 2020).

Para se produzir biodiesel a partir do óleo de microalgas empregam-se processos que já são utilizados para produzir biodiesel a partir de óleos vegetais e gorduras animais, a depender da composição do óleo, sobretudo em relação aos teores de ácidos graxos livres e saponificáveis. Esses processos são a transesterificação, a esterificação e o craqueamento térmico. Vale ressaltar que se pode empregar tanto a biomassa de microalgas quanto o óleo extraído para realizar a conversão, sendo a primeira opção denominada conversão *in situ* (BARCELOS et al., 2018).

Tabela 1.3: Comparação de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel.

Fonte de biodiesel	Produtividade em óleo (L/ha)
Mamona	806
Pinhão manso	1892
Milho	172
Soja	446
Canola	1190
Coco	2689
Óleo de palma	5950
Microalga*	58700

*variedades com teor de 30% (m/m) de óleo em massa seca.

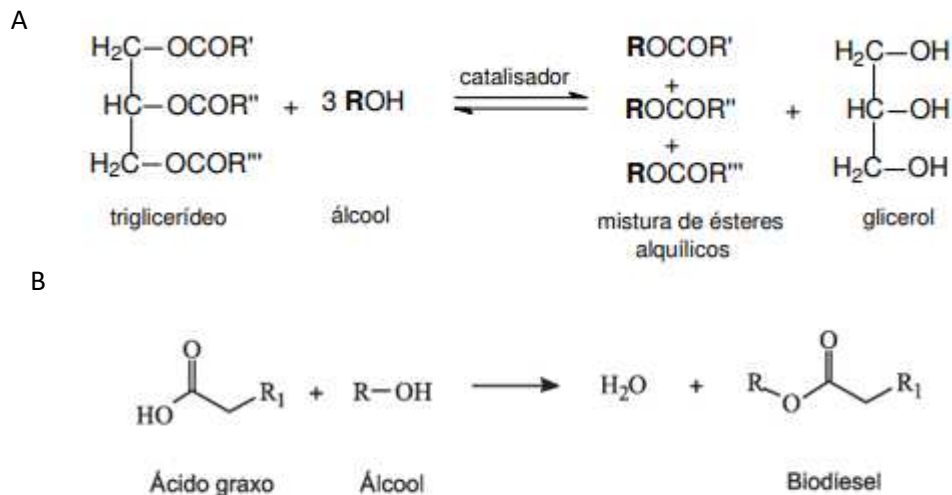
Fonte: Pereira et al. (2012).

Os óleos de microalga, normalmente, apresentam a seguinte composição de ácidos graxos: ácido palmitoléico (16: 1), ácido oleico (18: 1), ácido linoléico (18: 2), ácido linolênico (18:3) e os ácidos graxos saturados de palmítico (16: 0). Essa composição de ácidos graxo da microalga irá influenciar nas propriedades do combustível do biodiesel produzido a partir de microalgas. Por exemplo, quanto menor teor de ácidos graxos saturados, o biodiesel apresentará melhores propriedades de temperatura fria, porque os ésteres graxos saturados de cadeia longa aumentam dramaticamente o ponto de fluidez e turvação do

biodiesel. No entanto, o biodiesel que contém uma grande quantidade de compostos insaturados é oxidado mais rapidamente do que o diesel convencional, levando a sedimentos insolúveis que interferem no desempenho do motor (SAJJADI et al., 2018).

A transesterificação é considerada como o processo de conversão a biodiesel mais atrativo quando comparado a outros processos, uma vez que é mais usada por demandar condições de reações mais brandas e menor razão molar entre TAG e álcool que a esterificação, e não utiliza pressões e temperaturas elevadas como no craqueamento térmico. Esse processo utiliza uma reação entre o triacilglicerol e um álcool (sobretudo metanol ou etanol) em excesso sob aquecimento (60 °C) e na presença de um catalisador alcalino (Figura 1.1). A reação tem como produtos uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos e glicerol (GARCIA et al., 2008). No entanto, a rota de conversão por transesterificação não é recomendada para óleos de microalgas devido ao elevado índice de acidez (GONÇALVES et al., 2016). Nessa rota, ao se utilizar um catalisador alcalino ocorre à formação de sabão pela reação com os ácidos graxos livres causando emulsão, que impede a separação de fases e a reduz o rendimento da conversão a biodiesel (ROBLES-MEDINA et al., 2009)

Figura 1.1: (A) Transesterificação de um triglicerídeo e (B) Reação de esterificação de ácidos graxos.



Fonte: (A) Garcia et al., (2018) e (B) Suarez et al., (2009).

Uma alternativa para emprego da transesterificação para produção de biodiesel a partir de microalgas é usar lipases como catalisadores, devido à sua maior especificidade para a transesterificação de triacilglicerídeos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES)

ou ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs). O uso de enzimas como catalisadores exibem maior seletividade e maior atividade catalítica em reações de transesterificação sob condições operacionais suaves (25–60 ° C). Além disso, podem catalisar a transesterificação de matérias-primas que contêm altos níveis de AGL e água, com diminuição do risco de formação de sabão e emulsão. As desvantagens em relação ao uso de enzimas como catalisadores são: altos custos das enzimas, problemas na separação do produto do meio de reação, dificuldade em recuperar e reutilizar enzimas, desativação dos sítios ativos das enzimas pelos substratos (álcoois de cadeia curta como metanol e etanol) e pelo subproduto de glicerol (DE VASCONCELLOS *et al.*, 2018).

Haas e Wagner (2011) estudaram a produção de FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) de biomassa de algas por esterificação e transesterificação *in situ* de lipídios de biomassa de algas para produzir FAME com potencial produção de biodiesel. Para tal foi empregado biomassa de algas comercial, contendo 20,9 % em massa de óleo extraível com hexano. Destes, 35,1 % em massa é composto de ácidos graxos livres (AGL), 18,2 % TAG (triacilglicerol) e 8,8% MAG (monoacilgliceróis), representando 62,1 % do material extraível. Um planejamento experimental estatístico foi empregado para examinar coordenadamente os efeitos das quantidades de metanol, ácido sulfúrico e temperatura da reação (23-658 °C) no rendimento em FAMES em reações de 2 h. Três métodos de preparação da matéria-prima foram examinados – *in natura*, com secagem realizada em estufa e lavados com água com secagem posterior. O estudo mostrou que a secagem da matéria-prima reduziu a quantidade de metanol necessária, resultando em 83% do rendimento máximo obtido na proporção molar metanol: ácido graxo de 220: 1 (4 mL de metanol por grama de substrato), já a lavagem da biomassa com água não reduziu a quantidade de metanol necessária.

Já Chengzong (2018) patenteou um estudo no qual obteve o biodiesel de microalgas por esterificação, por meio da reação de metanol com óleo de microalga catalisada por tetrafenil metaloporfirina e óxido de alumínio.

1.3 Extração líquido-líquido

A extração de óleo de microalgas está em constante investigação, uma vez que os óleos são acumulados intracelularmente em microalgas oleaginosas na forma de gotículas lipídicas, que por sua vez requerem rompimento da parede celular seguido de extração para recuperá-los. A ruptura da célula de microalgas é muito desafiadora devido às suas características distintas, como alto teor de água, parede celular dura, presença de *algaenan* e

esporopolenina como biopolímeros que, por sua vez, criam obstáculos na extração eficiente de lipídios. Com as paredes celulares rompidas, permite-se a liberação dos componentes celulares, o que aumenta a eficiência do processo de extração, superando o gradiente de concentração associado à extração por solvente. Vários métodos convencionais de pré-tratamento são, constantemente, investigados para romper a integridade celular das células de microalgas para melhorar a extração lipídica, e cada método tem certas vantagens e desvantagens (M et al., 2019; KANDA et al., 2020; PATEL et al., 2020).

Como métodos de pré-tratamento e de extração têm-se, por exemplo: micro-ondas, ultrassom, cavitação hidrodinâmica, hidrólise ácida, oxidação, surfactantes, enzimático, fluido supercrítico, líquidos iônicos, combinação de solventes e extração e transesterificação simultâneos e outros. Como algumas das vantagens desses métodos (ou de alguns deles) têm-se o fato de serem simples, consumirem baixa energia, não empregarem solventes tóxicos, levarem a um alto rendimento de extração e serem ambientalmente e ecologicamente amigável. Já como algumas das desvantagens têm-se o custo do equipamento e operação poder ser elevados, necessitar de um alto custo energético, a combinação de solventes pode não ser ecologicamente amigável, o solvente a ser empregado pode ser tóxico, selecionar a enzima e sua combinação é importante e a recuperação do solvente requer energia (SATI *et al.*, 2019).

Dentre os métodos de extração de lipídios, o de quantificação de Bligh e Dyer (1959) é o mais empregado. O mesmo utiliza uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção de 1:2 em volume. O alto rendimento de lipídios neutros e polares extraídos a partir desse método é obtido pelo fato de a água presente nas células das microalgas aturarem junto ao clorofórmio:metanol. Embora seja um procedimento rápido e quantitativo, empregam solventes tóxicos e em grande quantidade relativa à massa da amostra, geralmente 30 mL por grama de amostra (PINTO et al., 2015). Dessa forma é necessário o emprego de solventes, preferencialmente verdes, e a redução da relação solvente: biomassa.

Além da escolha do método de extração, a definição do solvente é uma etapa importante para se atingir uma elevada eficiência de extração. Para tanto, faz-se necessário analisar as características da mistura inicial e do solvente, tais como: a seletividade, a miscibilidade, a densidade, a facilidade de recuperação, a viscosidade, a reatividade, a toxicidade e o custo (MOLINA GRIMA, GONZÁLEZ e GIMÉNEZ, 2013).

Outro método de extração que pode ser empregado é a extração líquido-líquido, que é uma operação unitária destinada a extrair um ou mais compostos de uma fase líquida para

uma segunda fase de maior afinidade. Nessa operação unitária, uma corrente líquida (alimentação) é colocada em contato com um solvente imiscível (ou parcialmente miscível) que é responsável por extrair um ou mais componentes da alimentação, denominados solutos. Com isso, são formadas duas fases: a primeira denominada de extrato, que é rica no soluto; e a segunda é a refinado ou resíduo, pobre em soluto. É importante ressaltar que o soluto é o componente no qual se tem interesse da extração (MORAES et al., 2015; BARCELOS et al., 2018).

Ao misturar substâncias líquidas em uma determinada faixa de composição, pode ocorrer a formação de duas fases líquidas ao invés de apenas uma. Isso é consequência da estabilidade do estado bifásico ser maior que o estado monofásico. O sistema encontra-se no equilíbrio líquido-líquido (ELL), se as fases do sistema bifásico estiverem em equilíbrio termodinâmico. Um sistema estando em equilíbrio requer igualdade de todos os potenciais que podem causar mudanças (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007).

A extração líquido-líquido envolve quatro etapas, sendo a primeira a mistura da solução constituída pelo soluto de interesse e o solvente extrator. A segunda etapa consiste na separação das fases, a terceira a remoção e recuperação do soluto resultante e, por último, tem-se a remoção e recuperação do solvente extrator (MORAES et al., 2015).

Dentre as vantagens apresentadas pela extração líquido-líquido, destaca-se seu baixo custo operacional, quando comparada a outras operações unitárias como a destilação. Como desvantagens, aponta-se a eventual dificuldade de separação da fase extrato da fase refinado quando se realiza a extração em matrizes complexas, tais como a biomassa de microalgas. Adicionalmente, a extração líquido-líquido requer, além da separação da fase extratora, a evaporação para a recuperação do solvente (GEANKOPLIS, 1993; SEADER et al., 2006).

Shin et al. (2014) investigaram a extração lipídica da microalga *Scenedesmus sp.* com hexano comprimido a quente (HCH). O desempenho da extração foi avaliado próximo ao ponto crítico do hexano e comparado com o da extração de hexano realizada em temperatura e pressão ambiente e com o método de quantificação de Bligh e Dyer. Os resultados mostraram que o HCH melhora significativamente o rendimento lipídico e a taxa de extração lipídica em comparação com o uso de hexano em condições ambientais. Além disso, altos rendimentos de frações lipídicas conversíveis em biodiesel foram rapidamente alcançados no ponto crítico do hexano, em um nível comparável ao do método de Bligh e Dyer.

Onumaegbu et al., (2019) examinaram um processo de extração de lipídios da biomassa da microalga *Scenedesmus quadricauda* úmida e rompida com microondas. Este

se mostrou eficaz para ruptura celular das algas, uma vez que a potência do microondas foi um fator significativo, entretanto o grau de ruptura celular pareceu diminuir após um certo tempo de pré-tratamento. O lipídio total de *Scenedesmus quadricauda* sp. foram extraídos usando uma mistura de metanol e ácido sulfúrico como solvente orgânico. Os autores realizaram um planejamento Box-Behken cujas variáveis foram: potência do microondas (W), o tempo de aquecimento (min) e o tempo de extração (hrs). Dessa forma, obtiveram um rendimento lipídico ideal de 49 % na potência de 600 W, tempo de aquecimento de 8 min e tempo de extração de 3,5 h.

Ellison, Overa e Boldor (2019) extraíram lipídios de uma mistura cultivada localmente de *Chlorella vulgaris* / *Cyanobacteria leptolyngbya* cujo pré-tratamento realizado foi a sonicação em um reator ultrassônico com um transdutor de fixação. Para a extração lipídica, foi aplicado um planejamento composto central (CCD) que empregou as variáveis: efeito da potência ultrassônica (350–750 W) e tempo de pré-tratamento (5–30 min). Dessa forma, verificou-se que a recuperação lipídica aumenta com a potência ultrassônica e o tempo de tratamento, já que o rendimento lipídico total (em base de biomassa seca) extraído pelo método de Bligh e Dyer variou de 8,3 % para algas não tratadas a 16,9 % para algas sonicadas com potência de 750 W por 30 min, o que corresponde a mais do que o dobro da recuperação lipídica devido ao pré-tratamento por ultrassom. Vale ressaltar que os autores empregaram tanto o método de quantificação baseado em Bligh e Dyer quanto a extração com o hexano e, com isso, obtiveram pelo primeiro o dobro da quantidade de lipídios.

Kalsum et al. (2019) extraíram lipídios da microalga *Spirulina platensis* com metanol e n-hexano em diferentes proporções volumétricas: 1:2, 1:1 e 1:0 (v/v). Para tal, realizou-se um aquecimento utilizando um micro-ondas (projetado para a realização dos experimentos) a 600 W por 40 min. O rendimento máximo obtido nesse período foi de 12,530 % de lipídios, comparado a apenas 1,293 % para a extração com Soxhlet.

Alam et al. (2019) realizaram a extração de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris* por meio do método TPP (particionamento trifásico) que apresentava duas etapas: incubação e extração. Na primeira, uma quantidade apropriada de sal foi adicionada a solução microalgal. Esta foi mantida em incubadora a uma temperatura próxima a 30 °C durante 1 h sendo agitada periodicamente. Na segunda, o solvente foi adicionado à solução salgada de microalga, e a extração foi mantida por certo período de tempo para garantir o contato suficiente entre células, solvente e sal. Cada teste continha 50 % de solução de microalgal, e o resto compreendia aos solventes etanol (E), acetato de etila (AE), AE: E nas razões 0,5, 1, 1,75 e 3

(v/v) e AE: E: DKP (ácido 2,5-piperazinadiona-1,4-diacético) nas razões de 2,5, 1,5, 1, 0,7 e 0,4 (v/v/v). O tempo de incubação foi de 2 h e o de extração variou de 30 min a 240 min. O sistema TPP foi mantido em banho-maria e submetido a diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A quantificação Bligh e Dyer foi usada para comparar ao método TPP. No sistema que empregava apenas o acetato de etila como solvente o rendimento de lipídios foi de 2,1 %, enquanto que na combinação de AE: E (1:1 v/v) o rendimento foi 15,7 %, sendo este o maior teor encontrado. Já no sistema AE: E: DKP o menor rendimento de lipídios foi 6,3 % na razão 0,4 (v/v/v) e o maior foi próximo a 16 % na razão 1,5 (v/v/v). O maior rendimento de lipídios obtido pelo método de superfície de resposta foi 16,08 % na razão AE: E igual a 1, na razão AE+E: DKP igual a 1,5 e temperatura de 60 °C.

1.4 Dados de equilíbrio

A representação dos dados de equilíbrio líquido-líquido pode ser realizada por meio de diagramas triangulares ou em coordenadas retangulares. Cada um dos componentes puros é alocado nos vértices dos triângulos, enquanto os lados representam a mistura binária. Já os pontos no interior do triângulo representam a mistura ternária. O limite de miscibilidade é representado pela curva binodal. Já as linhas de amarração (*tie-lines*) relacionam as composições das fases em equilíbrio, denominadas extrato e refinado. O ponto em que essas fases se igualam é chamado de ponto crítico (*plait point*) e neste não é possível realizar a separação de fases. Vale ressaltar que para estimar o grau de separação alcançado pela extração, é necessário analisar o coeficiente de partição ou distribuição que é a razão entre as concentrações do soluto na fase extrato e na fase refinado (GEANKOPLIS, 1993).

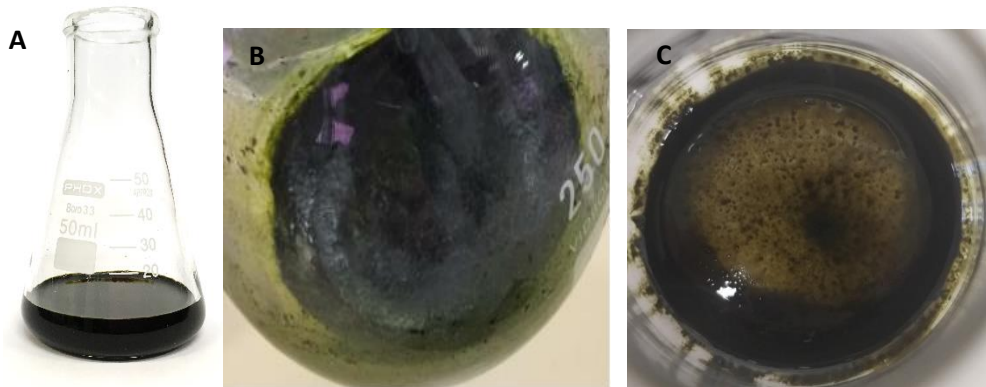
O coeficiente de partição ou distribuição é um importante parâmetro que pode ser determinado a partir dos dados de equilíbrio. Esse coeficiente representa a razão entre as concentrações do soluto na fase extrato e na fase refinado, sendo utilizado para quantificar o grau de separação a ser alcançado no processo de extração (GEANKOPLIS, 1993). Para sistemas de extração líquido-líquido no qual o soluto é são lipídios oriundos de microalgas e sistemas com solvente hidrofóbico e um solvente hidrofílico, os valores de coeficiente de partição acima da unidade indicam que menor é a polaridade da substância, o que implica em uma maior facilidade de atravessar as membranas celulares. Além disso, possibilita que um menor volume de solvente ou um número menor de estágios de equilíbrio possa ser usado para a extração (BESSA et al., 2015).

Dagostin et al. (2018) obtiveram dados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema constituído por óleo de soja, etanol anidro e acetato de etila em diferentes temperaturas (25 °C, 40 °C e 60 °C) ao estudarem a extração de óleo de soja com o acetato de etila como co-solvente. O objetivo do estudo foi aplicar ésteres etílicos como co-solventes, em baixas proporções, para promoção da extração de óleo de soja, obtendo-se, dessa forma, nos sistemas que havia ésteres, um aumento da solubilidade, à medida que as frações destes componentes e temperaturas eram maiores. Em relação ao uso do acetato de etila, viu-se que em temperaturas mais baixas, o efeito era mais pronunciado na extração bruta de óleo de soja.

Silve et al. (2018) se basearam no diagrama de equilíbrio construído por Skrzecz et al. (1999) para o sistema água, etanol e hexano para definirem a condição e extração de lipídios da microalga *Auxenochlorella protothecoides*. Dessa forma, empregaram a proporção volumétrica, 3: 54: 22 em volume (mL) para 1 g de biomassa seca. Os autores realizaram algumas tentativas visando à diminuição dessa proporção volumétrica, entretanto, viu-se a quantidade de água seria um impasse, uma vez que remover a água presente nas microalgas úmidas não seria um processo economicamente viável. Com isso, os autores chegaram à proporção volumétrica de 3: 18: 7,3 que levou a recuperação de 92 % e 72 % de lipídios de biomassa obtidas em cultivos mixotróficos e autotróficos, respectivamente.

Barcelos et al. (2018) construíram o diagrama de fases para o sistema óleo de microalga, hexano e etanol para diferentes temperaturas (35 °C, 40 °C e 45 °C) e teores de acidez (2%, 20% e 40%). Os pigmentos presentes no óleo bruto da microalga *Desmodesmus communis* conferem coloração escura ao mesmo, o que impede a visualização da turvação que caracteriza a formação de duas fases na obtenção dos dados para a construção à curva binodal (Figura 1.2). Assim, os autores empregaram uma mistura homóloga ao óleo de microalgas a partir de uma mistura de óleos e gorduras, e verificaram que os coeficientes de partição para os ácidos graxos livres obtidos em temperaturas distintas foram próximos da unidade, os coeficientes para a mistura de triacilgliceróis foram em torno de 0,8, o que permite seu enriquecimento em TAG por extrações sucessivas.

Figura 1.2: Óleo extraído das microalgas (A) *Desmodemus communis* BR007, (B) *Chlorella pyrenoidosa* e (C) *Scenedesmus obliquus* BR003.



Fonte: Laboratório de Biocombustíveis da UFV.

Por meio da revisão de literatura efetuada, ainda são escassos os trabalhos referentes ao uso de dados de equilíbrio que mostrem a separação dos componentes presentes no óleo de microalgas a partir de diferentes solventes.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE *Scenedesmus obliquus* BR003

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares que possuem a capacidade de armazenar lipídios, despertando interesse para a produção de biodiesel a partir dessa fonte de matéria-prima e motivando o desenvolvimento de inúmeras pesquisas. Além disso, são fonte de diversas substâncias de valor comercial e podem ser empregados para a produção dos mais diversos produtos como suplementos alimentares, fármacos, pigmentos. Esse estudo objetivou caracterizar a microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 quanto ao teor de água, cinzas, biomassa livre de cinzas, lipídios, proteínas e carboidrato. A microalga apresentou um teor de água de $(4,82 \pm 0,13) \%$, teor de cinzas de $(22,21 \pm 0,21) \%$ e o teor de massa seca livre de cinzas de $(73,08 \pm 0,81) \%$, e teor de lipídios de $(17,45 \pm 0,0025) \%$ e $(10,14 \pm 0,0055) \%$ por metodologias distintas, já o teor de carboidrato foi $(10,49 \pm 0,051) \%$ e o de proteína foi $(37,9 \pm 0,31) \%$.

1. INTRODUÇÃO

As algas são organismos fotossintetizantes que proporcionam fonte de carbono e energia para outros organismos. Essas são classificadas como macroalgas, que são as algas marinhas, e como microalgas, que são organismos unicelulares (SIRAKOV et al., 2015). Essas últimas são microrganismos aquáticos que apresentam características estruturais e morfológicas que as diferenciam entre si, mas são semelhantes quanto à fisiologia e apresentam um metabolismo parecido ao das plantas vasculares (DERNER et al., 2006; BARCELLOS et al., 2012).

As microalgas têm ganhado papel de destaque nos últimos anos como matéria-prima para a produção de biodiesel. Esses microrganismos apresentam grande capacidade para produzirem biomassa por unidade de área e em curto tempo, quando comparadas às outras fontes renováveis que comumente são empregadas para a produção de biodiesel, como a soja, o algodão e gado de corte. Outra vantagem é o fato de não apresentarem sazonalidade (período de safra) e não dependerem de condições específicas do solo. Além disso, algumas espécies de microalgas tem a capacidade de armazenar grande quantidade de óleo (SILVA; BACHOLSKY; JERÔNIMO, 2015; AGÊNCIA BRASIL, 2019).

Além do biocombustível, as microalgas são fonte de diversas substâncias de valor comercial e podem ser empregados para a produção dos mais diversos produtos como suplementos alimentares, fármacos, pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, proteínas e sais minerais (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

As microalgas são compostas principalmente de proteínas, lipídios e carboidratos. Esses compostos podem ser submetidos a processos termoquímicos com maior rendimento em óleo que biomassas compostas essencialmente por celulose, lignina e hemicelulose (PENG; WU; TU, 2000). Com isso, além do óleo proveniente da fração de lipídios das microalgas, as proteínas e carboidratos podem ser convertidos em óleo combustível ou gás por técnicas termoquímicas, conforme proposto por Dote et al. (1993) e Ginzburg (1993).

Com o exposto, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização da microalga *Scenedesmus obliquus* quanto ao teor de água, cinzas, biomassa livre de cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

O estudo foi realizado utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, pertencente à Coleção de Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis (LBC) do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Estado de Minas Gerais, e cultivada na planta piloto de produção de microalgas do LBC/DEA/UFV.

O cultivo da alga foi realizado em um tanque aberto com capacidade de 4000 L, com um meio de cultura de fertilizantes agrícolas. A intensidade de radiação média diária da luz solar direta foi de $752,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura variando entre 22 °C e 30 °C. A biomassa foi coletada no 16º dia de cultivo durante a fase estacionária de crescimento, por floculação assistida com polímero catiônico, obtendo-se um teor final de sólidos de 13 % em massa (Rocha et al., 2019)..

2.2 Caracterização físico-química da biomassa liofilizada

2.2.1 Teores de água, cinzas e biomassa livre de cinzas

Para a quantificação dos teores de água, cinzas e concentração de biomassa seca livre de cinzas foram empregadas às metodologias de Baxter e Rexing (2017). Primeiramente, calcinaram-se cadinhos a 500 °C por 1 h. Após a calcinação, o forno foi resfriado até 105 °C e os cadinhos foram colocados em dessecador até atingir o equilíbrio térmico com o ambiente, e posteriormente pesados. Pesou-se aproximadamente 1g de biomassa nos cadinhos e foram dispostos em estufa (MA035, Marconi, Brasil) à 105 °C, sendo pesados novamente após 24 h para determinação do teor de água. Os cadinhos e biomassa foram calcinados durante 5 h à 550 °C e após realizado o processo de resfriamento foram novamente pesados.

2.2.2 Teor de lipídios totais

O teor de lipídios totais foi determinado pela adaptação do método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Foram pesados 1 g de biomassa liofilizada em tubos de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico 8 mol L⁻¹ aos tubos, em estufa (MA035, Marconi, Brasil) à 65 °C e aguardou-se 15 h. Posteriormente foram adicionados 10 mL de etanol, 15 mL de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo. Os tubos foram agitados no sistema de tamboramento a 500 rpm durante 24 h. Os tubos contendo as misturas foram centrifugados (Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, Estados Unidos) a 5000 × g por 5 min. O sobrenadante (fase apolar) foi transferido para frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL, previamente secos e de massas conhecidas e submetidos a evaporação dos solventes a 90 °C. Aos tubos foram adicionados novamente 15 mL de éter de petróleo e 15 mL de éter etílico, para uma segunda extração nas mesmas condições. Ao total foram realizadas 5 extrações. Após a evaporação dos solventes de extração, os frascos tipo Erlenmeyer foram colocados na estufa (MA035, Marconi, Brasil) a 105 °C por 24 horas e novamente pesados. O teor de lipídios foi determinado como a razão entre a massa do extrato apolar obtido após as extrações e a massa de biomassa livre de cinzas utilizada.

O teor de lipídios também foi obtido pela adaptação do método Bligh e Dyer (1959). Nesse procedimento, pesou-se 1 g de biomassa seca em tubos de 50 mL, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol. A mistura foi agitada a 300 rpm por 24 horas, em temperatura de 25 °C. Em seguida, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e 9 mL de água, os tubos foram novamente agitados a 300 rpm por 1h. Após extração, o material foi centrifugado

a 7500 × g por 10 minutos e a fase inferior (apolar) foi coletada e filtrada em papel filtro Whatman nº 1 em frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL, previamente secos em estufa e de massas conhecidas. Foram realizadas mais 5 extrações nas mesmas condições adicionando-se 10 mL de clorofórmio aos frascos. As fases apolares foram adicionadas aos frascos já utilizados e foram colocados na estufa (MA035, Marconi, Brasil) a 50 °C por 24 horas e novamente pesados. O teor de lipídios foi determinado como a razão entre a massa do extrato apolar obtido após as extrações e a massa de biomassa livre de cinzas utilizada.

2.2.3 Teor de carboidratos totais

A quantificação de carboidratos foi realizada pelo método fenol-ácido sulfúrico em microplacas (Masuko et al, 2005) que compreende as etapas de extração de carboidratos intracelulares seguido do método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), utilizando-se glicose para a construção da curva padrão e a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

2.2.4 Teor de proteína total

O teor de proteína total foi determinado empregando uma das metodologias propostas por Afify et al. (2018). Por meio dessa metodologia, quantificou-se o total de nitrogênio pelo método Kjeldahl e o converteu em porcentagem de proteína utilizando o fator de conversão 5,89.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A biomassa da linhagem de *Scenedesmus obliquus* BR003 foi caracterizada quanto à composição centesimal, expressa em teores de umidade, cinzas, biomassa livre de cinzas, lipídios, carboidratos e proteínas.

3.1 Teores de água, cinzas e biomassa livre de cinzas

A Tabela 2.1 apresenta os valores médios e o intervalo de confiança a 95% para o teor de água, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas para a biomassa liofilizada.

Tabela 2.1: Teores de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas para a biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003

Parâmetro	Teor (% m/m)
Teor de água	4,82 ± 0,13
Teor de massa seca	95,18 ± 0,13
Teor de cinzas	22,21 ± 0,21
Teor de massa seca livre de cinzas	73,08 ± 0,81

Fonte: A autora.

Apandi et al. (2017) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em quatro diferentes concentrações de esgoto (10 %WM, 15 %WM, 20 %WM e 25 %WM) e utilizaram o meio BBM (Bold Basal Medium) como tratamento controle. Desse estudo, os autores verificaram que os teores de cinzas obtidos nos 5 cultivos foram 3,1 %, 7,1 %, 9,2 %, 12,0 % e 10,2 % (controle), respectivamente, havendo portando incremento de cinzas na biomassa oriundas de águas residuárias.

Ido et al. (2018) realizaram um delineamento experimental visando a otimização da extração de lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus* empregando uma mistura de hexano e isopropanol razão de 1:10 m/v como solvente e o método de rompimento utilizado em conjunto com a extração foi ultrassom. A microalga utilizada no estudo apresentou um teor de cinzas de 25,58 % em massa. Já Gong et al. (2018) investigaram o potencial da microalga *Scenedesmus* sp. como o principal ingrediente em alimentos com baixo teor de farinha de peixe de salmão do Atlântico. A microalga foi caracterizada apresentando um teor de cinzas médio de 8,3 % em massa. El-Chaghaby et al. (2019) estudaram a composição e propriedades antioxidantes de linhagens de *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* secas utilizando etanol a 96 % (v/v). Na etapa de caracterização, a microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou um teor de cinzas de 15,07 % e umidade de 2,57 % em massa seca.

Para este estudo, o teor de cinzas encontrado (22,21 ± 0,21) % (Tabela 2.2) foi próximo ao encontrado por Ido et al. (2018), todavia foi maior do que o encontrado pelos outros autores. Dessa maneira, por meio dos valores reportados na literatura para o gênero *Scenedesmus*, conclui-se que o teor de cinzas está relacionado com a contaminação inerente dos cultivos em tanques aberto, além da carga mineral característica nos nutrientes do cultivo. É importante ressaltar, que um alto teor de cinzas, pensando na produção de biodiesel de microalga, pode dar um efeito negativo no comportamento de combustível de biomassa

devido a problemas de incrustação e corrosão nos equipamentos necessários para a produção de biodiesel em larga escala (MUÑOZ *et al.*, 2015; KHOO *et al.*, 2020).

3.2 Teor de lipídios

Gupta *et al.* (2017) encontraram um teor de lipídios para a microalga *Scenedesmus obliquus* igual a 16,0 %, sendo próximo ao teor encontrado no presente trabalho que foi de $(17,45 \pm 0,0025)$ % obtido pelo método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986) e $(10,14 \pm 0,0055)$ % pelo método de Bligh e Dyer (1959).

Ahmad *et al.* (2019) investigaram tanto a aplicação da microalga *Scenedesmus obliquus* para a fito remediação de águas residuais quanto a acumulação de componentes bioquímicos nas células. Ao caracterizarem a microalga pelo método de Folch *et al.* (1957), obtiveram um teor de lipídios igual a $(26,5 \pm 1,5)$ % em massa seca.

An *et al.* (2020) estudaram os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio (NaNO_3 , NH_4Cl e $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1 e 2 mg L^{-1}) no crescimento e acúmulo de lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus*. O maior teor de lipídio (30,6 %) foi obtido para o cultivo com adição de 0,1 mg L^{-1} de NH_4Cl . Os autores empregaram o método de extração de lipídios descrito por Gan *et al.* (2016).

Por esses trabalhos, verifica-se que os teores de lipídios reportados na literatura foram maiores que o encontrado neste trabalho. A forma de cultivo da microalga pode ter contribuído para essa diferença nos teores de lipídios, onde não foi utilizada uma estratégia específica para o estímulo ao acúmulo de desse metabólito.

3.3 Teor de carboidratos

O teor de carboidratos da biomassa foi de $(10,49 \pm 0,051)$ %. Shankar *et al.* (2017) determinaram que o teor de carboidratos total para a microalga *Scenedesmus obliquus* variou entre 10,0 e 17,0 %, também próximo ao obtido por Mathimani *et al.* (2018). Entretanto, Gupta *et al.* (2017) e Ajala e Alexander (2020) encontraram um teor de carboidrato total igual a 20,4 % e 38,0 %, respectivamente, o que está relacionado as condições de cultivo e estratégia de coleta, uma vez que as condições de estresse podem direcionar o acúmulo de carbono na forma de carboidratos de reserva (amido), que pode ser empregado para a produção de bioetanol por microalgas.

3.4 Teor de proteínas

O teor de proteínas da biomassa em estudo foi de $(37,9 \pm 0,31) \%$. Batista et al. (2014) empregando diferentes meios de cultura para a microalga *Scenedesmus obliquus* e métodos clássicos e termogravimétricos para a extração de lipídios, proteínas, açúcares e cinzas conseguiram produzir biomassa com teores de proteínas igual a $(20,4 \pm 0,02) \%$ massa seca. Já Afify et al. (2018) encontraram um teor de $(34,45 \pm 0,01) \%$ de proteínas da *Scenedesmus obliquus* utilizando a extração com NaOH (pH 12) com posterior neutralização, e um teor de $(39,55 \pm 0,02) \%$ sem a neutralização. Por meio dos resultados desses dois estudos reportados na literatura, verifica-se que o teor de proteínas encontrado na caracterização da biomassa de *Scenedesmus obliquus* está próximo a valores reportados na literatura. Entretanto Ajala e Alexander (2020) obtiveram um teor de proteína igual a $64,6 \%$ ao cultivarem a *Scenedesmus obliquus* em águas residuais suplementada com diferentes níveis de sulfato, nitrato e fosfato. Assim como para o acúmulo de lipídios e carboidratos, fatores de estresse nutricionais também podem resultar em maior acúmulo de proteínas, o que demonstra a grande plasticidade dessa espécie como fonte de matéria prima para a produção de biocombustíveis (lipídios e carboidratos) e alimentos com elevado teor de proteínas.

Alguns lipídios neutros poderão ficar armazenados na célula de microalgas na forma de pequenos corpos oleosos, que são extraídos por um solvente apolar, como o hexano. Já outros lipídios neutros e os polares, formam complexos com proteínas na membrana celular. As associações proteína-lipídio não podem ser quebradas com um solvente de extração apolar, e mesmo alguns solventes de extração polares mostraram-se menos adequados do que misturas com um solvente halogenado (RYCKEBOSCH *et al.*, 2014). Logo um alto teor de proteínas junto a uma escolha de solvente (s) inadequada pode dificultar a extração de óleo que impactará na produção do biodiesel.

CONCLUSÃO

A caracterização da microalga *Scenedesmus obliquus* quanto ao teor de água, cinzas, biomassa livre de cinzas, lipídios, proteínas e carboidrato apresentou resultados concordantes com os da literatura, sendo as diferenças nos valores encontrados com os de outros trabalhos decorrentes do método de cultivo de microalga a ser empregado. O método proposto por J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986)

conseguiu extrair mais lipídios do que o método de Bligh e Dyer (1959), uma vez que nesse houve um rompimento químico da biomassa liofilizada.

CAPÍTULO 3 - DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA O SISTEMA ÓLEO MODELO, ACETATO DE ETILA E ÁGUA

Isabela Nascimento Tavares Ferreira¹, Rita de Cássia Superbi de Sousa¹, Marcio Arêdes Martins²

¹Departamento da Química, ²Departamento da Engenharia Agrícola

Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 36570-000

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares que possuem a capacidade de armazenar lipídios, despertando interesse para a produção de biodiesel a partir dessa fonte de matéria-prima e motivando o desenvolvimento de inúmeras pesquisas. Entretanto, o elevado teor de ácido graxo livre presentes no óleo bruto dificulta a etapa de refino do óleo e a transesterificação com catálise alcalina. Esse estudo objetivou determinar dados de equilíbrio líquido-líquido de sistema de extração de lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus*, composto por óleo, acetato de etila e água. Como óleo de microalgas apresenta uma coloração escura, fez-se necessário empregar uma mistura de óleos comerciais cuja composição de ácidos graxos fosse próxima ao do óleo da microalga. As curvas de equilíbrio experimental e a composição das linhas de amarração foram determinadas para 2%, 20% e 40% de AGL, a 25 °C, 35 °C e 45 °C. Três equações empíricas foram usadas para correlacionar os dados das curvas binodais. Os parâmetros da equação de melhor ajuste foram usados junto com os dados de separação de fase, os quais foram obtidos pelo método gravimétrico, para a construção das linhas de amarração. A consistência das linhas de amarração foi verificada usando as equações de Othmer – Tobias e Bancroft. A partir dos dados de equilíbrio, foram determinados os coeficientes de distribuição do lipídio neutro, do AGL, a seletividade do acetato de etila e a eficiência de extração para os sistemas estudados. Verificou-se que temperatura e o teor de acidez influenciaram a curva binodal e, conseqüentemente, o equilíbrio das fases. Os valores de seletividade indicaram que o uso do acetato de etila como solvente favoreceu a concentração de AGL e dos lipídios neutros (TAGs) na fase rica em acetato de etila (superior). O aumento da acidez inicial do óleo diminuiu o coeficiente de partição dos lipídios neutros e aumentou a seletividade. Os valores de seletividade nos sistemas contendo óleo bruto de *S. obliquus*, apresentaram valores inferiores ao apresentado pelo óleo modelo estudado, em decorrência da diminuição dos coeficientes de partição do AGL e lipídio neutro

nesses sistemas. Essa diferença se deve não somente à acidez relativamente superior do extrato bruto (41,57%), mas também pela complexidade da composição do óleo de microalgas.

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento no preço dos combustíveis atrelado a preocupação com os impactos ambientais provenientes das emissões de carbono têm motivado a busca de fontes renováveis e tecnologias sustentáveis que satisfaçam as necessidades da indústria e do mercado. Dentre as fontes renováveis potenciais, as microalgas têm ganhado papel de destaque nos últimos anos como matéria-prima para a produção de biodiesel. Um dos motivos para isso é o fato de que estes microrganismos apresentam grande capacidade para produzirem biomassa por unidade de área e tempo quando comparadas às outras fontes renováveis que comumente são empregadas para a produção de biodiesel, como o óleo de soja, a gordura animal e o óleo de algodão. Outra vantagem é o fato de não apresentarem sazonalidade (período de safra) e não dependerem de condições específicas do solo. Além disso, algumas espécies de microalgas tem a capacidade de armazenar grande quantidade de óleo (SILVA; BACHOLSKY; JERÔNIMO, 2015; AGÊNCIA BRASIL, 2019).

Apesar de todos os avanços dos últimos anos provenientes das inúmeras pesquisas com microalgas, ainda não foi possível desenvolver um processo economicamente viável para a produção de biodiesel de microalgas. As etapas de extração e refino do óleo bruto ainda não são consolidadas já que para extrair o óleo da biomassa seca ou úmida, os lipídios polares como fosfolipídios e glicolipídios, além de lipídios neutros, como triacilgliceróis (TAG) também acabam sendo extraídos (BARCELOS et al, 2018).

A extração líquido-líquido é uma alternativa para a extração de lipídios de microalgas que envolve quatro etapas, sendo a primeira a mistura da solução constituída pelo soluto de interesse e o solvente extrator. A segunda etapa consiste na separação das fases, a terceira a remoção e recuperação do soluto resultante e, por último, tem-se a remoção e recuperação do solvente extrator (MORAES et al., 2015). Dentre as vantagens da extração líquido-líquido, destaca-se seu baixo custo operacional quando comparada a outras operações unitárias como a destilação, por exemplo. Como desvantagens, aponta-se a eventual dificuldade de separação das fases extrato e refinado quando se realiza a extração em matrizes complexas, tais como a biomassa de microalgas (GEANKOPLIS, 1993; SEADER et al., 2006).

Muitos autores têm estudado solventes para a extração de lipídios dispersos em fase aquosa, após o rompimento das células. No caso das microalgas, muitos solventes têm a capacidade de desestabilizar a membrana celular e de organelas, solubilizando lipídios polares em conjunto com os lipídios neutros de reserva. Assim, as características desejáveis na seleção de um solvente de extração são: ser volátil, para que a remoção posterior seja fácil; não deve reagir com os lipídios, formar um sistema bifásico de forma seletiva aos lipídios (MOLINA GRIMA, GONZÁLEZ e GIMÉNEZ, 2013). Solventes como clorofórmio, metanol, etanol, iso-propanol e hexano foram avaliados por inúmeras pesquisas na extração, como por exemplo, tem-se os trabalhos de Gorgich et al. (2019), Li et al. (2019), El-Sheekh et al. (2019) e Prémat et al. (2020). Entretanto, solventes verdes e líquidos iônicos vem se destacando e sendo cada vez mais estudados como alternativa, o que é corroborado por Jeevan Kumar et al. (2017), De Jesus e Filho (2020), Krishanan et al. (2020) e Tang e Ro Row (2020). Nesse sentido, os trabalhos de Lohani, Fallahi e Muthumarappan (2015), Dagostin et al. (2018) e Da Rosa et al. (2019), empregaram o acetato de etila na extração de lipídios com vantagens quando comparados aos solventes comumente empregados, uma vez que é menos tóxico, mais barato e necessita de um menor tempo de extração.

Para a obtenção de dados de equilíbrio pela titulação turbidimétrica é necessário ter acesso ótico a mistura. Entretanto, o óleo de microalgas possui composição complexa e de coloração escura, o que impossibilita a determinação dos dados de equilíbrio por essa técnica (BARCELOS et al., 2019). Com isso, optou-se pela utilização de uma mistura de óleos com perfil de ácidos graxos próximo ao óleo de *Scenedesmus obliquus* (óleo modelo), e contendo majoritariamente triacilgliceróis (TAG) e ácidos graxos livres (AGL). O objetivo deste estudo foi avaliar a separação de lipídios neutros em óleos de elevada acidez, como o óleo bruto de microalga, dispersos em fase aquosa, para tal foram determinados dados de equilíbrio para os sistemas bifásicos contendo óleo modelo, acetato de etila e água deionizada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Acetato de etila (CAS número 141-78-6) da marca Química Moderna. Água deionizada. Éter etílico (CAS número 60-29-7) da marca Alphatec com pureza de 99,8%. Éter de petróleo (CAS número 8032-32-4) da marca Qhemis. Álcool etílico (CAS 64-17-5) da marca Qhemis. Óleo comercial de palma da marca Cepera, óleo comercial de Chia da marca Giroil e óleo comercial de Coco da marca Natural Life. A cepa da microalga *Scenedesmus*

obliquus utilizada pertence à coleção de cultura de microalga e cianobactéria da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 Preparo do óleo modelo

Devido à composição complexa e escura do óleo bruto da microalga fez-se necessário identificar uma mistura de óleos comerciais tendo como base a composição de ácido graxo do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*. Para a obtenção da mistura de óleos a ser empregada, investigou-se o óleo de coco, de chia, de palma, de soja, de girassol e de canola. Para o preparo do óleo modelo foram considerados os ácidos graxos em quantidades majoritárias, com 16 e 18 carbonos, característico de óleos de linhagens do gênero *Scenedesmus* (ROCHA *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2019). Dessa forma, chegou-se na mistura de óleos que continha óleos de palma (65% m/m), de chia (20% m/m) e de coco (15% m/m), pois seu perfil graxo mais se aproximava daquele do óleo bruto da microalga em estudo.

Para a obtenção do perfil de ácidos graxos dos óleos da microalga *Scenedesmus obliquus* e dos óleos comerciais empregou-se a metodologia adaptada de Guihéneuf, Schmid e Stengel (2015) e utilizou-se o cromatógrafo a gás (CG 2010, Shimadzu, Japão) nas seguintes condições: injeção direta de 1 μL da amostra, rampa de aquecimento linear de 60 °C para 330 °C a 20 °C min^{-1} e alta velocidade linear para melhor resolução de pico (Apêndice A).

2.3 Preparo do ácido graxo livre

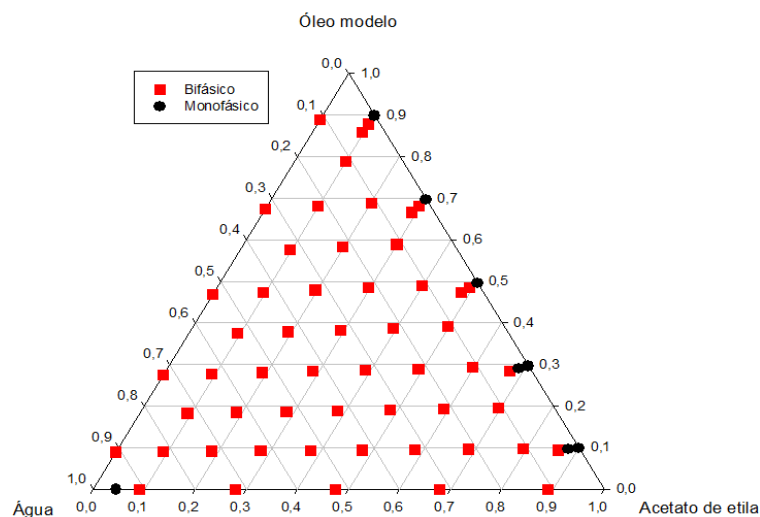
Os óleos comerciais apresentam um teor de acidez baixo (menos de 3 %), enquanto a acidez dos óleos de microalgas é usualmente elevada, na ordem de 40 % (BARCELOS *et al.*, 2018). Dessa forma, fez-necessário a adição de ácido graxo ao óleo modelo visando a obtenção de um teor de acidez mais elevado. Para tal, empregou-se a metodologia proposta por Barcelos *et al.* (2018) A acidez foi determinada pelo método da acidez titulável segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.4 Mapeamento do sistema ternário

Não foi possível encontrar na literatura nenhum dado de equilíbrio líquido-líquido para o sistema óleo + água + acetato de etila. Dessa forma, realizou-se primeiramente um

mapeamento do sistema ternário para entender onde estaria a região bifásica e a monofásica. Para tal, um conjunto de pontos experimentais (Apêndice B) foram definidos visando determinar se mistura formaria ou não duas fases, ou seja, se a mistura ficaria ou não turva. Dessa forma, o diagrama de equilíbrio (Figura 3.1) foi obtido mostrando que há uma grande região bifásica e duas curvas binodais. É importante destacar que as diferentes misturas foram testadas nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C, não sendo evidenciadas diferenças expressivas para as três temperaturas, com as concentrações pré-definidas utilizadas. Os pontos foram quantificados em volume e convertidos para fração mássica considerando a densidade de cada componente nas três temperaturas.

Figura 3.1: Diagrama de mistura ternária óleo modelo (40% AGL) + acetato de etila + água a 25°C.



Fonte: A autora.

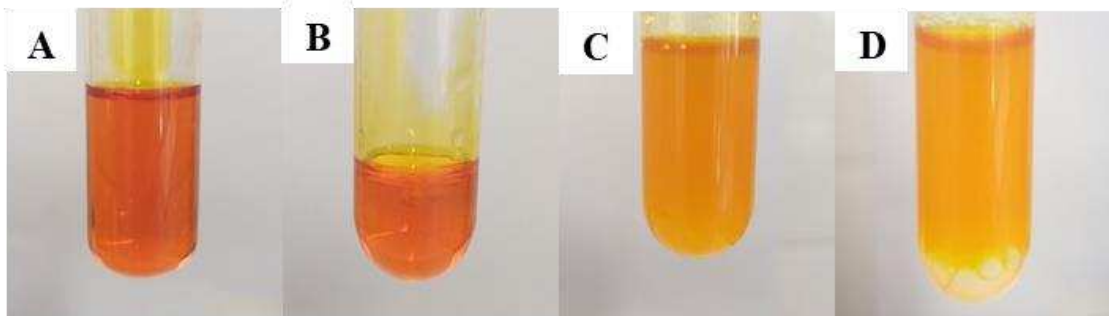
2.5 Determinação da curva binodal

Havendo identificado a região bifásica, obteve-se a curva binodal do sistema bifásico contendo óleo modelo (componente 1), acetato de etila (componente 2) e água deionizada (componente 3) nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C e contendo 2, 20 e 40 % de AGL. Dessa forma, foi possível avaliar a influência da acidez e da temperatura na separação de fases.

Foi construída a curva binodal para o sistema óleo modelo (2, 20 e 40 % AGL) + água + acetato de etila nas temperaturas 25, 35 e 45 °C. Para isso, ajustou-se a temperatura e adicionou-se 1 g do óleo modelo em um tubo de vibro. Após estabilização da temperatura, foi adicionada uma determinada quantidade de água até perceber a formação de duas fases.

Procedeu-se então a adição gradual de acetato de etila até não ser percebida a formação das fases. A Figura 3.2 ilustra o procedimento da titulação turbidimétrica. A cada mudança do comportamento das fases, as massas de água e acetato foram registradas. Repetiu-se o procedimento de titulação até serem obtidos pontos suficientes para a construção da curva.

Figura 3.2: Ilustração da metodologia de titulação turbidimetria a 25 °C: (A) óleo a 2 % AGL límpido, (B) após a primeira adição de água, e (C) a mistura óleo, água e acetato de etila antes e (D) após a separação das fases.



Fonte: A autora.

Os modelos (equações 1, 2 e 3) foram ajustados aos dados experimentais para obtenção das curvas binodais. A equação 1 foi originalmente proposta por Merchuk, Andrews e Asenjo (1998) apresentando 3 parâmetros ajustáveis. Com o intuito de aumentar a precisão do ajuste, outros colaboradores propuseram equações empíricas (2 e 3) que também descrevessem a curva binodal, porém com 4 parâmetros ajustáveis (ALVAREZ-GUERRA et al., 2016; HAN et al., 2012; LI et al., 2014; MERCHUK; ANDREWS; ASENJO, 1998).

$$w_1 = a \exp(bw_2^{0,5} - cw_2^3) \quad (1)$$

$$w_1 = a + bw_2^{0,5} + cw_2 + dw_2^2 \quad (2)$$

$$w_1 = \exp(a + bw_2^{0,5} + cw_2 + dw_2^2) \quad (3)$$

em que w_1 é a fração mássica de óleo modelo; w_2 é a fração mássica de acetato de etila e a , b , c e d são os parâmetros de ajuste dos modelos.

2.6 Determinação das linhas de amarração

As linhas de amarração foram determinadas pelo método gravimétrico descrito por Merchuk et al. (1998). Para obtenção das linhas de amarração, cinco misturas (óleo modelo, água e acetato de etila) foram preparadas com composições pertencentes à região bifásica, que

foram determinadas pela curva binodal, utilizando óleo modelo com acidez de 2, 20 e 40 % nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C (totalizando doze sistemas). Os componentes da mistura foram pesados e adicionados a um tubo de 15 mL, o qual foi submetido à agitação vigorosa em vortéx por alguns minutos, para total contato entre os componentes. Em seguida, os tubos foram mantidos fechados e em repouso para que ocorresse a separação entre as fases e o equilíbrio fosse estabelecido. As duas fases (extrato e refinado) foram separadas e pesadas em balança analítica.

Os dados de separação das fases obtidos pelo método gravimétrico foram aplicados a uma regra da alavanca (balanço de massa) que relaciona a massa da fase superior e inferior da mistura e a massa total da mesma (MERCHUK et al., 1998), juntamente com os parâmetros da equação para as curvas binodais. Como duas curvas binodais foram encontradas, as equações 4 e 5 apresentam parâmetros diferentes.

$$w_1^t = a + b w_2^{t,0,5} + c w_2^t + d w_2^{t,2} \quad (4)$$

$$w_1^b = e + f w_2^{b,0,5} + g w_2^b + h w_2^{b,2} \quad (5)$$

$$w_1^t = \frac{w_1^m}{\alpha} - \left[\frac{1-\alpha}{\alpha} \right] w_1^b \quad (6)$$

$$w_2^t = \frac{w_2^m}{\alpha} - \left[\frac{1-\alpha}{\alpha} \right] w_2^b \quad (7)$$

$$\alpha = \frac{m_t}{m_{total}} \quad (8)$$

em que w_1^t é a fração em massa do óleo modelo no topo; w_1^b é a fração mássica do óleo modelo na base; w_2^t é a fração mássica de acetato de etila no topo; w_2^b é a fração mássica de acetato de etila na base; m_t é a massa total da fase topo e m_{total} é a massa total do sistema (topo e base), α é uma fração mássica (razão massa topo pela massa total (topo + base)).

A confiabilidade das linhas de amarração foi verificada pelas equações empíricas de correlação propostas por Othmer-Tobias (equação 9) e Bancroft (equação 10).

$$\left(\frac{1-w_2^t}{w_2^t} \right) = (k_1 \left(\frac{1-w_1^b}{w_1^b} \right)^n) \quad (9)$$

$$\left(\frac{w_3^b}{w_1^b} \right) = (k_2 \left(\frac{w_3^t}{w_2^t} \right)^r) \quad (10)$$

em que w_2^t é a fração mássica de acetato de etila na fase superior, w_1^b é a fração mássica do óleo modelo na fase inferior, w_3^b e w_3^t são as frações mássicas de água nas fases inferior e superior, respectivamente e k_1 , k_2 , n e r são os parâmetros de ajuste. A partir da regressão da equação linearizada são obtidos os parâmetros e o coeficiente de determinação (R^2) para a avaliação da confiabilidade dos dados experimentais, ou seja, pelo valor de R^2 será determinado se houve ou não confiabilidade das linhas de amarração.

O comprimento das linhas de amarração (CLA) foi calculado a partir da equação 11, enquanto que a inclinação das linhas de amarração (ILA) foi calculada a partir da equação 12.

$$CLA = \sqrt{(w_1^t - w_1^b)^2 + (w_2^t - w_2^b)^2} \quad (11)$$

$$ILA = \frac{(w_1^t - w_1^b)}{(w_2^t - w_2^b)} \quad (12)$$

em que w_1^t é a fração em massa do óleo modelo no topo; w_1^b é a fração mássica de óleo modelo na base; w_2^t é a fração mássica de acetato de etila no topo; w_2^b é a fração mássica de acetato de etila na base.

Os coeficientes de partição dos lipídios neutros (K_{LN}) e do AGL (K_{AGL}), assim como a seletividade do acetato de etila (S) tanto para o óleo modelo estudado como para o óleo bruto foram calculados a partir das frações mássicas de lipídios neutros e AGL nas fases extrato e refinado, utilizando-se as equações 12, 13 e 14.

$$K_{AGL} = \frac{w_{AGL}^t}{w_{AGL}^b} \quad (12)$$

$$K_{LN} = \frac{w_{LN}^t}{w_{LN}^b} \quad (13)$$

$$S = \frac{K_{AGL}}{K_{LN}} \quad (14)$$

em que w_{AGL}^t e w_{AGL}^b são a fração mássica do AGL no topo e base, respectivamente, w_{LN}^t e w_{LN}^b a fração mássica do LN no topo e base, respectivamente.

2.7 Determinação da eficiência de extração

A eficiência da extração (EE) do AGL e do LN no sistema foi calculada pelo balanço de massa, sendo expressa por meio da razão entre a massa de AGL na fase topo e da massa total de AGL (fase topo + fase base).

$$EE_{AGL} = 100 \frac{m_{AGL}^t}{m_{AGL}^t + m_{AGL}^b} \quad (15)$$

$$EE_{LN} = 100 \frac{m_{LN}^t}{m_{LN}^t + m_{LN}^b} \quad (16)$$

$$EE_{Total} = 100 \frac{m_{Total}^t}{m_{Total}^t + m_{Total}^b} \quad (17)$$

em que m_{AGL}^t é a massa de AGL no topo e m_{AGL}^b é a massa de AGL na base, m_{LN}^t é a massa de LN no topo e m_{LN}^b é a massa de LN na base, enquanto que m_{Total}^t é a massa total na base, m_{Total}^t é a massa total no topo e m_{Total}^b é a massa de LN na base.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização do óleo bruto da microalga *Scenedesmus obliquus*

O óleo bruto extraído da microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou um teor de acidez de $41,57 \pm 0,63$ %. Este alto valor confirma a grande quantidade de ácido graxo livre desta fonte de lipídio. A principal característica do óleo da microalga estudada é um teor considerável de ácido alpha-linolênico (ômega-3) que também está presente de forma significativa no óleo comercial de chia (Tabela 3.1). Além disso, o óleo da *Scenedesmus obliquus* apresenta um teor elevado de ácido palmítico, assim como o óleo comercial de palma (Tabela 3.1). O óleo comercial de coco foi utilizado para auxiliar o ajuste do perfil de ácidos graxos do óleo modelo (MOPCC-Mistura de óleo de palma, coco e chia) ao do óleo da microalga.

Tabela 3.1: Composição de ácidos graxos de óleos utilizados no óleo modelo e do óleo bruto de *Scenedesmus obliquus*.

Ácido Graxo	Óleo de Palma Comercial	Óleo de Chia Comercial	Óleo Coco Comercial	Óleo de Palma + Óleo de Chia + Óleo de Coco	<i>Scenedesmus obliquus</i>
C16:0	23,17	7,70	7,81	18,07	25,33
C16:X	0,00	0,00	0,00	0,00	3,02
C18:0	3,49	3,01	2,87	3,46	4,64
C18:X	73,04	89,29	7,21	65,98	58,06
TOTAL	99,7	100,00	17,89	87,51	91,05

Fonte: A autora.

3.2 Preparo do óleo modelo

A partir da composição de ácidos graxos de óleos comerciais e da microalga *Scenedesmus obliquus* que está apresentada na Tabela 3.1, uma mistura contendo óleo de palma (65 % m/m), óleo de chia (20 % m/m) e óleo de coco (15 % m/m) foi formulada para fornecer uma mistura de óleo próxima em composição de ácidos graxos ao óleo de *Scenedesmus obliquus*. Os ácidos graxos foram produzidos por saponificação seguida de acidificação e adicionados a essa mistura de óleo, produzindo amostras com teores próximos a 2, 20 e 40 % de AGL. Por balanço de massa, foi determinada a quantidade de AGL que deveria ser adicionada ao óleo modelo (1,76 % AGL) para que os teores de 20 e 40 % fossem obtidos. O teor de acidez final dessas três misturas foi verificado pelo método da acidez titulável (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

3.3 Curva binodal

Os dados de equilíbrio foram obtidos por meio de titulação turbidimétrica para sistemas contendo 2, 20 e 40 % (m/m) AGL nas temperaturas de $(25 \pm 0,5)$, $(35 \pm 0,5)$ e $(45 \pm 0,5)$ °C (Apêndice C). Para determinar o modelo mais indicado (equação 1, 2 e 3) para descrever o comportamento da curva binodal, analisou-se os coeficientes de correlação (R^2) e o desvio padrão (sd) obtidos com os parâmetros de ajuste a partir da correlação dos dados binodais experimentais para todos os sistemas estudados e que estão apresentados nas Tabelas 3.2 a 3.4. Apesar dos altos coeficientes de correlação da equação 1 ($> 0,9939$) e para equação 3 ($> 0,9923$), o modelo não descreveu bem o formato da curva binodal encontrada, o que pode ser observado na Figura 3.3. Entretanto, a equação 2 descreveu adequadamente a curva

binodal e com maiores coeficientes de correlação ($> 0,999$) e baixo desvio padrão ($< 0,0090$), sendo, portanto, a equação 2 a mais indicada ao se considerar todos os sistemas estudados.

Tabela 3.2: Valores dos Parâmetros da Equação 1 do sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) a 25, 35 e 45 °C.

% AGL	a	b	c	R ²	sd
25 °C					
2	1,0185	-0,5323	2,8697	0,9969	0,0158
20	1,0234	-0,5475	3,1236	0,9982	0,0106
40	0,9914	-0,4974	3,2275	0,9939	0,0194
35 °C					
2	1,0183	-0,6074	2,8759	0,9950	0,0193
20	1,0114	-0,4972	3,4924	0,9970	0,0155
40	1,0399	-0,6036	2,9074	0,9953	0,0165
45 °C					
2	1,0175	-0,4879	3,3878	0,9951	0,0203
20	1,0313	-0,5851	3,1115	0,9948	0,0192
40	1,0279	-0,5863	3,4759	0,9955	0,0178

Fonte: A autora.

Tabela 3.3: Valores dos Parâmetros da Equação 2 do sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) a 25, 35 e 45 °C.

% AGL	a	B	c	d	R ²	sd
25 °C						
2	0,9861	-0,1044	-0,6955	-0,3191	0,9999	0,0026
20	0,9655	-0,0275	-0,7589	-0,3875	0,9997	0,0041
40	0,9417	0,0983	-0,9760	-0,2465	0,9995	0,0069
35 °C						
2	0,9727	-0,0615	-0,8808	-0,1369	0,9996	0,0051
20	0,9843	-0,1580	-0,5266	-0,5763	0,9997	0,0052
40	0,9989	-0,2029	-0,5617	-0,4154	0,9992	0,0069
45 °C						
2	0,9921	-0,1909	-0,4304	-0,6684	0,9991	0,0090
20	0,9884	-0,0633	-0,8546	-0,2361	0,9996	0,0056
40	0,9880	-0,0943	-0,8133	-0,3049	0,9997	0,0048

Fonte: A autora.

Tabela 3.4: Valores dos Parâmetros da Equação 3 do sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) a 25, 35 e 45°C.

% AGL	A	B	c	d	R ²	sd
25 °C						
2	-0,0028	-0,5576	0,7306	-2,9052	0,9956	0,0194
20	0,0102	-0,6504	0,8722	-3,0769	0,9983	0,0106
40	-0,0475	-0,2899	0,2547	-2,7403	0,9947	0,0180
35 °C						
2	-0,0169	-0,3899	0,1520	-2,4096	0,9962	0,0172
20	-0,0014	-0,6559	1,0716	-3,5420	0,9937	0,0216
40	0,0087	-0,5177	0,4457	-2,5938	0,9940	0,0189
45 °C						
2	0,0008	-0,5359	0,7555	-3,1674	0,9923	0,0261
20	-0,0036	-0,3717	0,1855	-2,5549	0,9959	0,0173
40	-0,0016	-0,4723	0,4358	-2,9873	0,9955	0,0178

Fonte: A autora.

Duas curvas binodais foram obtidas, entretanto uma delas (à esquerda/base) foi a mesma para todos os nove sistemas (Tabela 3.5). Assim como para a curva superior, a equação 2 foi a que levou ao maior coeficiente de correlação (0,9996), sendo a mais indicada para descrever o comportamento da curva binodal.

Tabela 3.5: Valores dos Parâmetros da Equação 1, 2 e 3 do sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) a 25, 35 e 45°C.

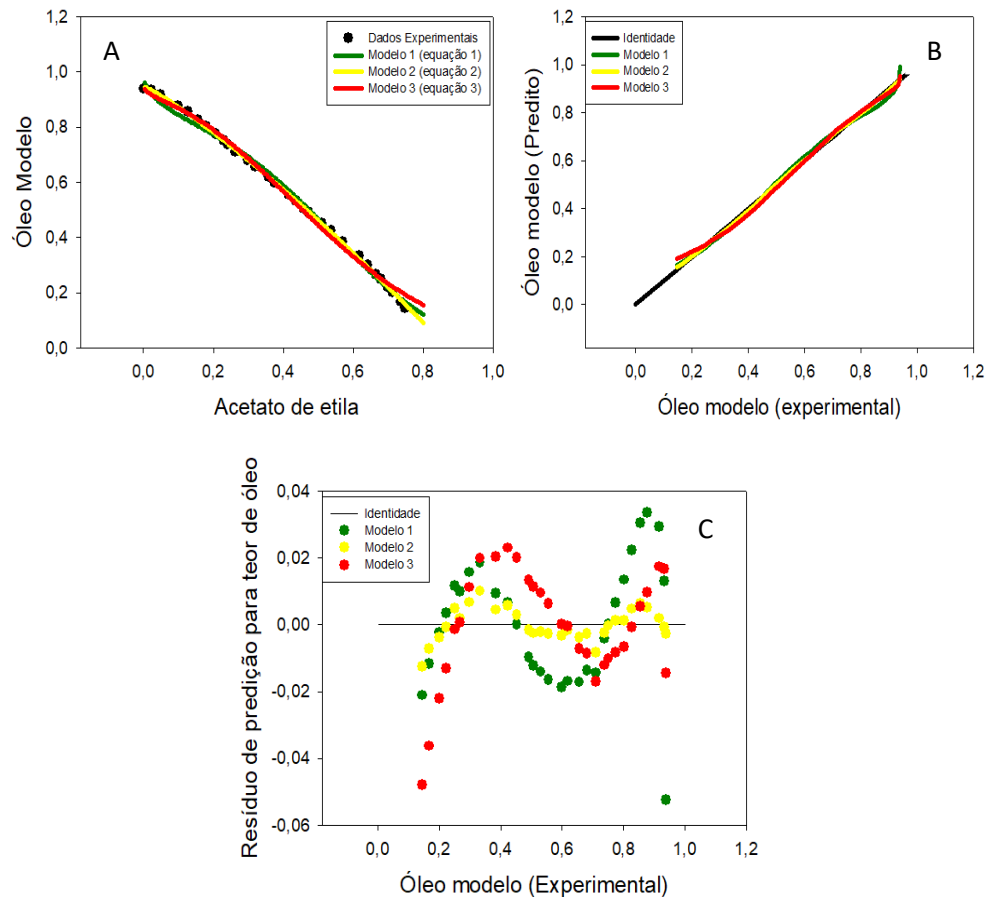
% AGL	E	f	g	h	R ²	sd
Equação 1						
2, 20 e 40	0,0770	6,0945	6885,9648		0,9463	0,0018
Equação 2						
2, 20 e 40	0,0088	-0,0137	0,6981	-10,5731	0,9996	0,0003
Equação 3						
2, 20 e 40	-4,6984	-3,2700	76,1710	-1100,8261	0,9736	0,0020

Fonte: A autora.

Pela Figura 3.3, observa-se no gráfico (A), (B) e (C) que o modelo 2 (equação 2) tem maior aderência a linha de identidade. Além disso, concluiu-se que os modelos são

tendenciosos e superestimam as concentrações de óleo nos extremos (baixas e altas concentrações). Ainda assim, verifica-se que os desvios do modelo 2, embora também tendencioso, apresentam menos resíduos, o que mostra maior aderência aos dados.

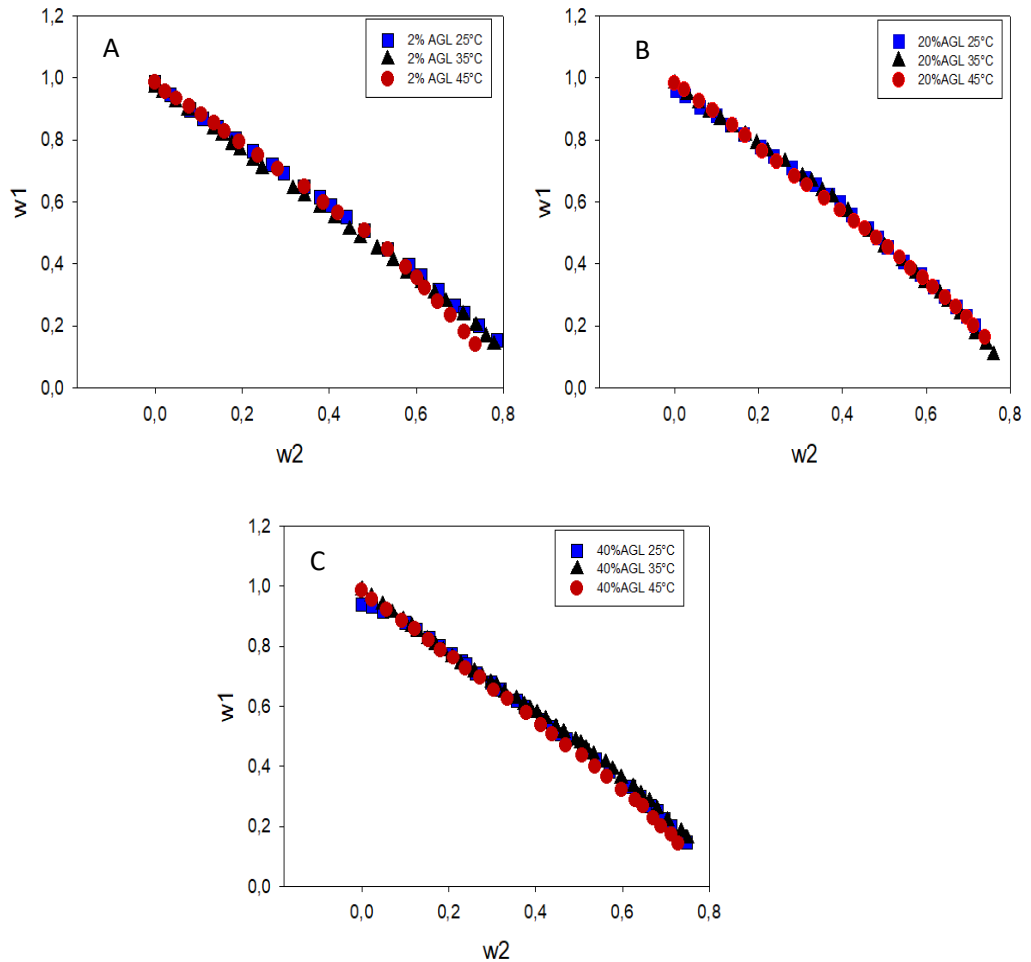
Figura 3.3: (A) Qualidade de ajuste, (B) Identidade e (C) Resíduos dos modelos para 40% AGL e 25 °C.



Fonte: A autora.

A fim de avaliar se a temperatura e o teor de acidez influenciavam no comportamento das curvas binodais avaliaram-se as inclinações das retas. Dessa forma fixou-se o teor de acidez (Figura 3.4) e a temperatura (Figura 3.5). Em relação a influencia da temperatura no comportamento da curva binodal, vê-se que para o teor de acidez igual a 2 %, ao aumentar a temperatura, diminui-se a região bifásica, já para os teores de acidez de 20 e 40 % diferenças expressivas no comportamento da curva binodal não foram observados na Figura 3.4.

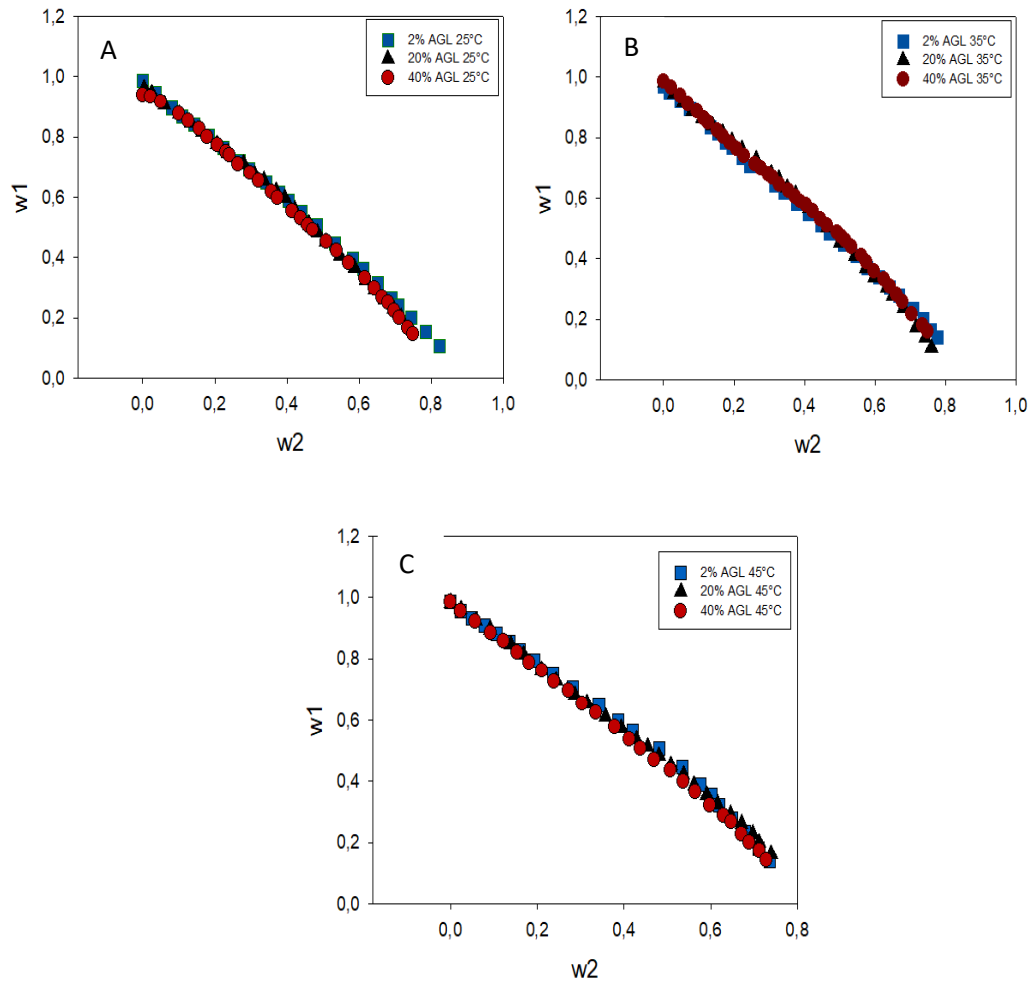
Figura 3.4: Influência do teor de temperatura no comportamento das curvas binodais (A) 2 % AGL, (B) 20 % AGL e (C) 40 % AGL, em que w_1 é a fração mássica do óleo modelo e w_2 a fração mássica do acetato de etila.



Fonte: A autora.

Em relação ao teor de acidez, percebe-se que ao aumentar o teor de acidez, aumenta-se a região monofásica, o que não é vantajoso, pois indica que um maior teor de água estará retido na fase extrato (rica em acetato de etila). É importante dizer que esse mesmo comportamento pode ser observado nas três temperaturas estudadas (25, 35 e 45 °C) (Figura 3.5).

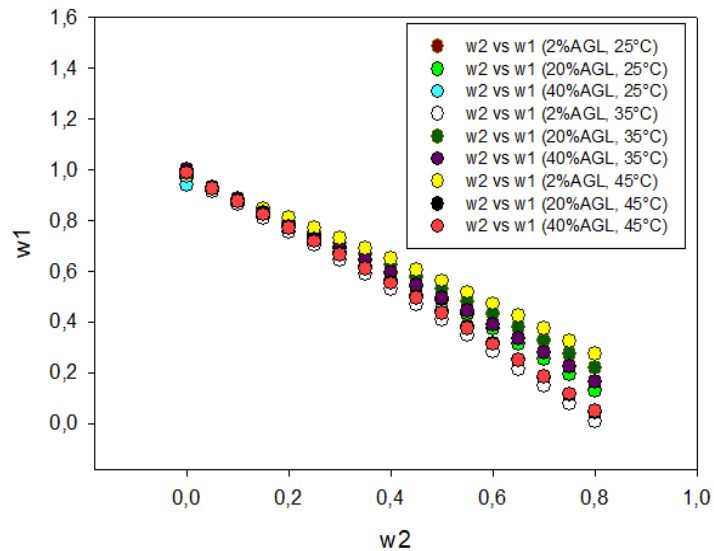
Figura 3.5: Influência do teor de acidez no comportamento das curvas binodais (A) 25 °C, (B) 35 °C e (C) 45 °C, em que w_1 é a fração mássica do óleo modelo e w_2 a fração mássica do acetato de etila.



Fonte: A autora.

Além disso, foi obtido o gráfico da comparação da resposta (Figura 3.6) dos modelos através do teste de identidade que permitiu concluir que a análise de identidade (Apêndice D) mostrou que os modelos diferem quanto à predição da fração mássica do óleo para as diferentes temperaturas e teores de ácido graxo livre, mas a Figura 3.6 mostra que a temperatura e acidez não afetam significativamente o equilíbrio de fases somente quando se tem uma maior fração mássica de óleo modelo ou uma menor fração mássica de acetato de etila.

Figura 3.6: Comparação das respostas considerando os três teores de AGL e as três temperaturas estudadas, em que w_1 é a fração mássica do óleo modelo e w_2 é a fração mássica do acetato de etila.



Fonte: A autora.

3.4 Linhas de amarração

Nas Tabelas 3.6 a 3.8 são apresentadas as composições referentes aos sistemas (misturas), fases topo (rica em óleo e acetato de etila) e base (rica em água) que correspondem à composição dos cinco pontos de misturas dos nove sistemas estudados. Além disso, são apresentados os valores referentes ao comprimento e inclinação das linhas de amarração.

Tabela 3.6: Dados das linhas de amarração para o sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) com 2 % AGL a 25, 35 e 45 °C.

Sistema Total		Topo		Base		CLA	ILA
w óleo	w ae	w óleo	w ae	w óleo	w ae		
25 °C							
0,7876	0,0802	0,8950	0,0840	0,0130	0,0530	0,8825	28,4516
0,6360	0,1454	0,8160	0,1690	0,0082	0,0620	0,8148	7,5492
0,5137	0,1939	0,7350	0,2530	0,0080	0,0620	0,7517	3,8065
0,4135	0,2377	0,6530	0,3390	0,0053	0,0660	0,7028	2,3724
0,3060	0,2809	0,5410	0,4480	0,0046	0,0670	0,6579	1,4078
35 °C							
0,7709	0,0907	0,8670	0,0960	0,0140	0,0510	0,8542	18,9556
0,6855	0,1249	0,8140	0,1490	0,0076	0,0630	0,8109	9,3764
0,5975	0,1606	0,7740	0,1890	0,0047	0,0670	0,7789	6,3056
0,4973	0,1999	0,7070	0,2560	0,0040	0,0680	0,7277	3,7394
0,4018	0,2436	0,6210	0,3400	0,0034	0,0690	0,6745	2,2791
45 °C							
0,7533	0,0864	0,8890	0,0900	0,0120	0,0550	0,8777	25,0571
0,5823	0,1449	0,8210	0,1660	0,0120	0,0560	0,8164	7,3545
0,4527	0,1969	0,7300	0,2560	0,0092	0,0600	0,7469	3,6774
0,3551	0,2502	0,6290	0,3660	0,0071	0,0630	0,6918	2,0526
0,2523	0,2954	0,5120	0,4840	0,0061	0,0650	0,6569	1,2074

Fonte: A autora.

Tabela 3.7: Dados das linhas de amarração para o sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) com 20 % AGL a 25, 35 e 45 °C.

Sistema Total		Topo		Base		CLA	ILA
w óleo	w ae	w óleo	w ae	w óleo	w ae		
25 °C							
0,7876	0,0802	0,8940	0,0840	0,0130	0,0540	0,8815	29,3667
0,6386	0,1441	0,8110	0,1670	0,0083	0,0620	0,8096	7,6450
0,5137	0,1939	0,7340	0,2480	0,0047	0,0670	0,7515	4,0295
0,4088	0,2378	0,6490	0,3360	0,0016	0,0710	0,6995	2,4429
0,3060	0,2787	0,5380	0,4410	0,0012	0,0710	0,6520	1,4509
35 °C							
0,7658	0,1037	0,7930	0,1910	0,0095	0,0600	0,7944	5,9809
0,6337	0,1655	0,7320	0,2560	0,0068	0,0640	0,7502	3,7770
0,5407	0,2036	0,8660	0,1100	0,0140	0,0520	0,8540	14,6897
0,4504	0,2381	0,6650	0,3220	0,0062	0,0650	0,7072	2,5634
0,3600	0,2854	0,5660	0,4140	0,0059	0,0650	0,6599	1,6047
45 °C							
0,7144	0,1038	0,8640	0,1140	0,0100	0,0590	0,8558	15,5273

0,5579	0,1820	0,7550	0,2230	0,0085	0,0610	0,7639	4,6079
0,4356	0,2432	0,6510	0,3310	0,0043	0,0670	0,6985	2,4498
0,3452	0,2883	0,5540	0,4240	0,0037	0,0680	0,6554	1,5459
0,2450	0,3385	0,4290	0,5380	0,0035	0,0720	0,6310	0,9130

Fonte: A autora.

Tabela 3.8: Dados das linhas de amarração para o sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) com 40 % AGL a 25, 35 e 45 °C.

Sistema Total		Topo		Base		CLA	ILA
w óleo	w ae	w óleo	w ae	w óleo	w ae		
25 °C							
0,8167	0,0870	0,8900	0,0900	0,0140	0,0510	0,8769	22,4615
0,6334	0,1658	0,7900	0,1820	0,0058	0,0650	0,7928	6,7022
0,4820	0,2394	0,6680	0,3050	0,0036	0,0660	0,7061	2,7799
0,3499	0,2949	0,5460	0,4290	0,0006	0,0720	0,6519	1,5279
0,2474	0,3462	0,4140	0,5420	0,0006	0,0720	0,6260	0,8797
35 °C							
0,7754	0,0863	0,8830	0,0910	0,0120	0,0550	0,8717	24,1944
0,6630	0,1297	0,8300	0,1460	0,0066	0,0640	0,8275	10,0415
0,5506	0,1647	0,7750	0,2040	0,0036	0,0680	0,7833	5,6722
0,4527	0,2051	0,7010	0,2810	0,0032	0,0690	0,7293	3,2915
0,3696	0,2255	0,6420	0,3400	0,0017	0,0710	0,6945	2,3802
45 °C							
0,7533	0,0847	0,8840	0,0900	0,0120	0,0560	0,8727	25,6471
0,5823	0,1343	0,8080	0,1640	0,0100	0,0590	0,8049	7,6000
0,4527	0,1779	0,7200	0,2480	0,0086	0,0610	0,7356	3,8045
0,3551	0,2096	0,6350	0,3270	0,0076	0,0630	0,6806	2,3763
0,2523	0,2442	0,5120	0,4370	0,0069	0,0640	0,6279	1,3541

Fonte: A autora.

Pelos resultados apresentados pelas Tabelas 3.6 a 3.8, vê-se que, de forma geral, o comprimento e a inclinação das linhas de amarração diminuem com a adição de acetato de etila, o que é coerente, uma vez que atua como um solvente entre o componente polar (água) e apolar (lipídios). Além disso, indica a necessidade de um volume menor de acetato de etila no processo de extração que deve ocorrer em vários estágios.

Na Tabela 3.9 são apresentados os parâmetros de ajuste e os coeficientes de correlação das equações obtidos por meio das correlações empíricas fornecidas por Othmer – Tobias (equação 9) e Bancroft (equação 10). Por meio dos coeficientes de correlação, que foram altos em ambos os modelos, em todos os sistemas estudados, observa-se que houve consistência das linhas de amarração experimentais.

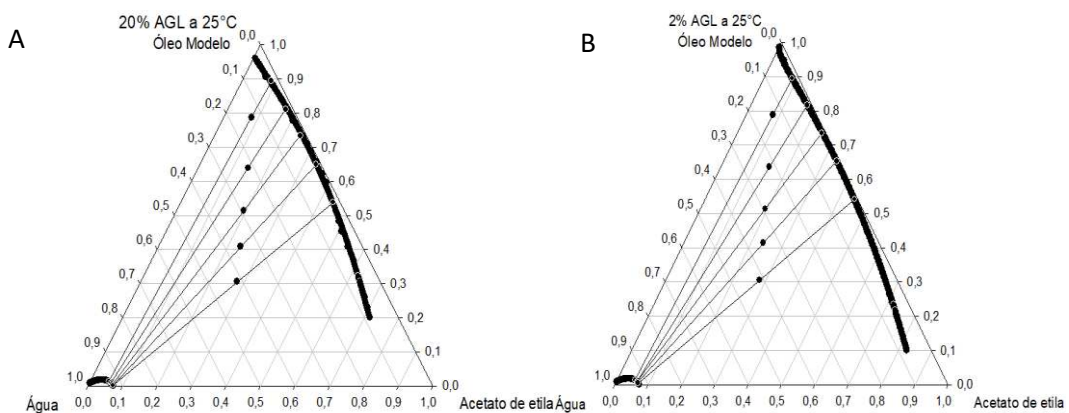
Tabela 3.9: Parâmetros de ajuste obtidos por Othmer-Tobias (Equação 9) e Bancroft (Equação 10) para o sistema Óleo Modelo (TAG + AGL) (1) + Acetato de etila (2) + Água (3) com 2, 20 e 40 % AGL a 25, 35 e 45 °C.

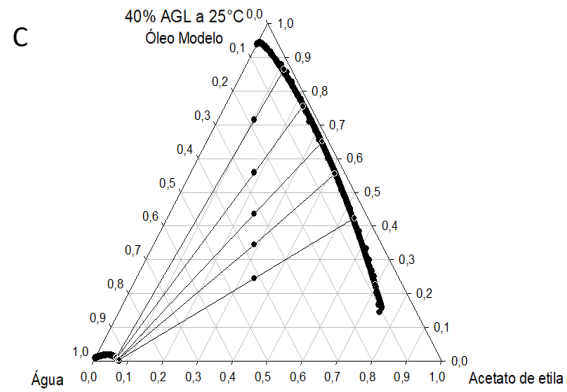
%AGL	k_1	N	k_2	R	R_1^2	R_2^2
25 °C						
2	0,1338	4,8040	0,6733	1,6124	0,9578	0,9305
20	0,4589	2,3984	0,2708	0,9948	0,9384	0,8943
40	0,1970	4,0381	0,4401	1,3337	0,8919	0,8556
35 °C						
2	0,3656	2,8676	0,3042	0,9587	0,9259	0,9587
20	0,1701	4,1987	0,6027	1,4788	0,9330	0,9588
40	0,4215	2,6479	0,3536	1,3336	0,9651	0,9504
45 °C						
2	0,0653	6,0665	0,8064	1,7182	0,9122	0,9126
20	0,5213	2,1107	0,0856	0,1944	0,9205	0,8346
40	0,0266	7,9559	0,5836	1,5847	0,9971	0,9042

Fonte: A autora.

Os diagramas de equilíbrio mostrados nas Figuras 3.7-3.9 permitem a determinação da composição em três diferentes condições de temperatura para o sistema bifásico onde é possível separar lipídios de microalgas, como TAG e AGL, por polaridade. A avaliação do desempenho e eficiência da separação líquido-líquido é dada pelos coeficientes de distribuição de lipídios neutros e AGL, bem como seletividade de solvente (equações 10-12).

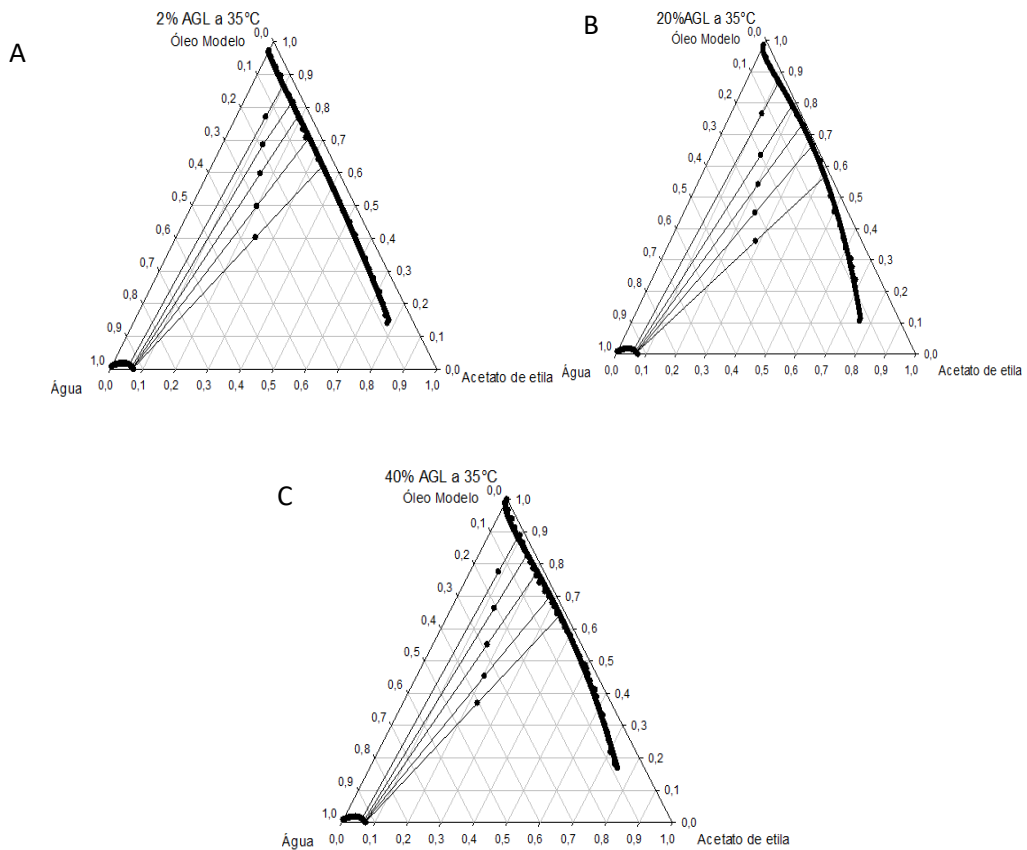
Figura 3.7: Curvas binodais e linhas de amarração para o sistema contendo teores de AGL de (A) 2 , (B) 20 e (C) 40 % a 25 °C em coordenadas triangulares.





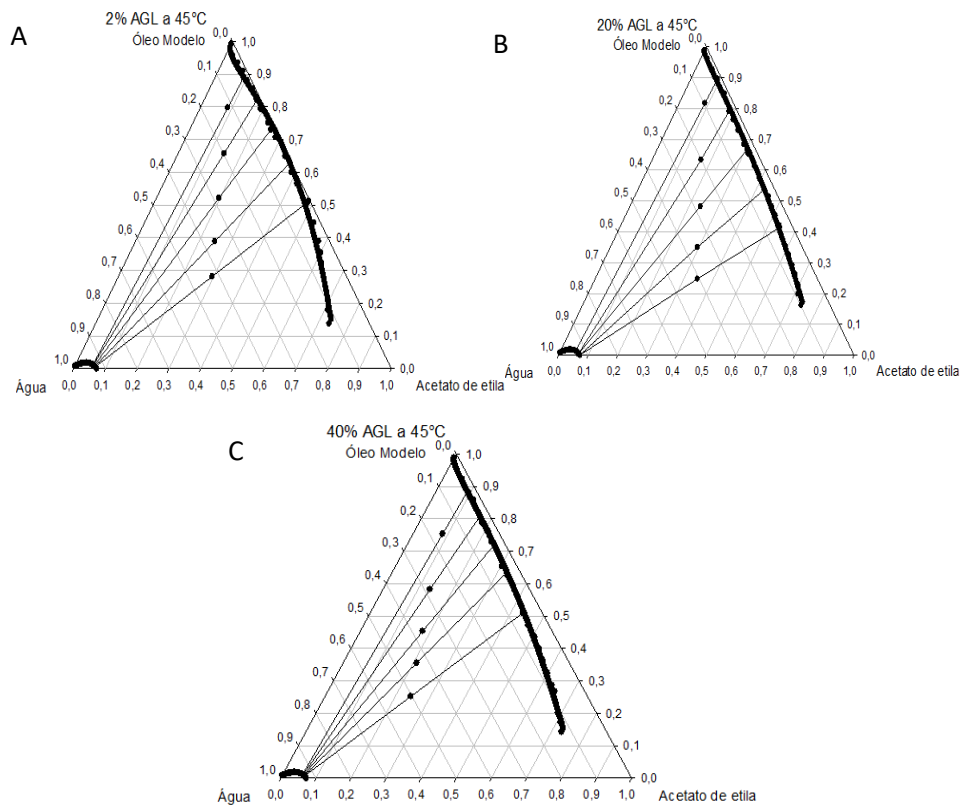
Fonte: A autora.

Figura 3.8: Curvas binodais e linhas de amarração para o sistema contendo teores de AGL de 2 % (A), 20 % (B) e 40 % (C) a 35 °C em coordenadas triangulares.



Fonte: A autora.

Figura 3.9: Curvas binodais e linhas de amarração para o sistema contendo teores de AGL de 2 % (A), 20 % (B) e 40 % (C) a 45 °C em coordenadas triangulares.



Fonte: A autora.

3.5 Determinação dos coeficientes de partição e seletividade

Na Tabela 3.10 estão apresentados os coeficientes de partição tanto dos lipídios neutros (LN) quanto dos ácidos graxos livres (AGL), assim como a seletividade dos nove sistemas estudados e para o óleo bruto da microalga *Scenedesmus obliquus*. Além disso, também é apresentada a eficiência de extração (EE). Para a obtenção de todos os valores apresentados na Tabela 3.10 empregou-se o terceiro ponto de mistura de cada um dos nove sistemas que estão apresentados nas Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8.

Tabela 3.10: Valores dos coeficientes de partição de lipídios neutros (K_{LN}), AGL (K_{AGL}), seletividade (S) e eficiência de extração (EE) para os sistemas com teores de AGL de 2 %, 20 % e 40 % nas temperaturas 25 °C, 35 °C e 45 °C.

Temperatura	K_{AGL}	K_{LN}	S	%EE _{AGL}	%EE _{LN}	%EE _{Total}
2%						
25°C	7,47	2,34	3,19	88,19	70,08	84,94
35°C	5,35	1,93	2,77	84,25	65,84	80,45
45°C	3,85	2,09	1,84	79,39	67,62	76,9
20%						
25°C	15,01	1,72	8,73	93,75	63,23	90,94
35°C	12,93	1,72	7,52	92,82	63,24	90,49
45°C	11,91	1,83	6,51	92,25	64,66	89,15
40%						
25°C	30,2	1,42	21,2	96,8	58,76	95,15
35°C	33,18	1,16	28,59	97,07	53,79	89,15
45°C	27,99	1,06	26,5	96,55	51,52	94,18
<i>Scenedesmus obliquus</i> (41,57 % AGL)						
25°C	16,91	1,32	12,8	94,42	56,93	63,2
35°C	12,74	0,92	13,91	92,72	47,81	52,61
45°C	16,11	0,94	17,09	94,15	48,51	53,92

Fonte: A autora.

Devido aos valores para o K_{AGL} terem sido maiores que 1 (Tabela 3.10), pode-se afirmar que os ácidos graxos livres migraram para a fase superior/extrato (rica em acetato de etila). O mesmo foi encontrado por Shiozawa et al (2020) que obtiveram dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido e realizaram a modelagem termodinâmica (NRTL) de sistemas compostos de óleo refinado (soja, caroço de algodão e farelo de arroz) + mistura comercial de acilgliceróis parciais (MAG e DAG) + ácidos graxos livres (AGL) + ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) + etanol nas temperaturas de 303,2 e 318,2 K, uma vez que, em relação aos valores de coeficiente de partição encontrados para o ácido graxo livre, verificou-se que houve uma preferência do AGL em migrar para a fase rica em acetato de etila.

Além disso, pode-se observar que para teores maiores de acidez, valores maiores para os coeficientes de partição foram obtidos. Isso indica, segundo Gonçalves e Meirelles (2004), a necessidade de uma menor quantidade de solvente ou um número reduzido de estágios de equilíbrio possa ser usada para a extração.

Os valores de seletividade apresentados na Tabela 3.10 indicam ainda que o uso do acetato de etila como solvente favoreceu a concentração de AGL e de óleo neutro na fase extrato, o que pode ser confirmado pela inclinação das linhas de amarração nos diagramas de

equilíbrio (3.6, 3.7 e 3.8). Porém, posto que a seletividade é calculada pela razão entre os coeficientes de distribuição do AGL e de lipídios neutros (equação 10), observa-se que com o aumento da acidez inicial do óleo, menores quantidades de lipídios neutros estarão presentes na fase extrato, de modo que os sistemas com baixo teor de AGL tendem a ter maiores coeficientes de distribuição de lipídios neutros (K_{LN}) e, deste modo, menores valores de seletividade. Essa constatação permite a separação do óleo de microalgas usando acetato de etila em uma fração rica em lipídios polares e outra (refinado) rica em lipídios apolares.

Huang et al. (2015) obtiveram dados de equilíbrio líquido-líquido para sistemas contendo óleo de palma ou frações de óleo de palma, dois álcoois de cadeia curta (metanol e etanol) e água na faixa de temperatura de 293,15 a 333,15 K e a pressão atmosférica. Foi observado que a solubilidade entre óleos e álcoois, considerando todos os solventes selecionados, apresenta comportamento proporcional ao da temperatura, ou seja, o aumento da temperatura aumenta a solubilidade e, conseqüente, aumenta a miscibilidade. Para este trabalho, é possível perceber pela Tabela 3.10, que o aumento da temperatura leva a diminuição do K_{AGL} e seletividade. Já em relação ao teor de acidez de 40 %, vê-se que os valores obtidos para os coeficientes de partição e seletividade são maiores do que para o óleo bruto da *Scenedesmus obliquus*, isso é justificado pela complexidade do óleo de microalga comparado ao óleo modelo. A adição da água no solvente estendeu a região bifásica e diminuiu a solubilidade entre óleos e álcoois, o que impacta o processo de reação na produção de biodiesel. Por outro lado, é relevante para o refino de óleos comestíveis, pois a inclusão de água nos solventes aumenta a seletividade do solvente e conseqüentemente reduz a perda de óleo neutro na extração por solvente. Para a produção de biodiesel por transesterificação, que é o método mais empregado, a quantidade água no meio reacional poderá aumentar a quantidade de álcool (etanol ou metanol) necessário para a obtenção de biodiesel, isso deveria ser considerado ao trabalhar com o óleo de biomassa microalgal úmida para a síntese de biodiesel (MACÍAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2015).

Barcelos et al. (2018) construíram o diagrama de fases para o sistema óleo da microalga *Desmodesmus communis* com hexano e etanol para diferentes temperaturas (35, 40 e 45 °C) e teores de acidez (2, 20 e 40 %) e verificaram que os coeficientes de partição para os ácidos graxos livres obtidos em distintas temperaturas foram próximos da unidade, os coeficientes de distribuição do AGL foi entre 0,82 a 1,05 e o dos lipídios neutros 0,1 a 0,28, o que permite seu enriquecimento em TAG por extrações sucessivas. Os valores obtidos para K_{AGL} podem ser explicados pelo fato de os AGL terem migrado para a fase extrato (rica em

etanol) e os sistemas com elevado teor de AGL tendem a ter maiores coeficientes de distribuição de lipídios neutros (K_{LN}). A melhor condição operacional para a extração de AGL livres e lipídios neutros é a 40 % AGL e a 35 °C.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos neste estudo, verificou-se que é possível separar os lipídios de óleos com alto teor de acidez, como os óleos de microalgas, por polaridade usando o modelo de sistema ternário, contendo óleo modelo, acetato de etila e água. Os ácidos graxos livres presentes no óleo modelo empregado migraram preferencialmente para a fase rica em acetato de etila em todos os sistemas estudados com eficiência de extração do AGL é de até 97,07 %. Entretanto, vê-se que a eficiência da extração de LN foi mais baixa, indicando que se extrai mais AGL. Já em relação, a eficiência de extração total, para o óleo bruto de microalga os valores foram menores do que para o óleo modelo, o que é justificado pela complexidade do óleo que dificulta o processo de extração de lipídios.

Em relação às equações de ajustes, viu-se que todos os três modelos ajustaram-se aos dados experimentais, sendo o modelo 2 o que mais apresentou aderência aos dados. Além disso, as linhas de amarração foram testadas quanto a sua confiabilidade segundo as equações de Othmer-Tobias e Bancroft, indicando boa correlação aos dados experimentais.

A temperatura e a acidez influenciam a curva binodal e, conseqüentemente, o equilíbrio das fases, uma vez que ao aumentar a concentração de acetato de etila, têm-se um efeito mais evidente da temperatura e do teor de AGL. E o inverso ocorre ao aumentar a concentração de óleo modelo.

Entretanto o aumento da acidez inicial do óleo causou um aumento dos coeficientes de distribuição de ácido graxo livre e, conseqüentemente, aumento dos valores de seletividade. Assim, o uso de acetato de etila é recomendado para o fracionamento de óleos com alto teor de ácidos graxos livres, como óleo de *Scenedesmus obliquus*.

CAPÍTULO 4 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DA BIOMASSA ÚMIDA DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* COM ACETATO DE ETILA

Isabela Nascimento Tavares Ferreira¹, Rita de Cássia Superbi de Sousa¹, Marcio Arêdes Martins²

¹Departamento da Química, ²Departamento da Engenharia Agrícola

Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 36570-900

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares que possuem a capacidade de armazenar lipídios, despertando interesse para a produção de biodiesel e alimentos a partir dessa fonte de matéria-prima. Entretanto, o elevado teor de ácidos graxos livres presentes no óleo bruto dificulta a etapa de refino. Esse estudo objetivou otimizar a extração de lipídios homólogos ao de microalgas dispersos em fase aquosa com teor de 1 % (v/v) com acetato de etila. Os parâmetros utilizados na otimização foram o tempo de extração (1, 2 e 4 h), a razão entre as fases aquosa e solvente (1:2, 1:4 e 1:10 v/v) e nas temperaturas 25, 35 e 45°C. A partir das condições otimizadas (1 h de extração, razão entre as fases aquosa e solvente 1:10 v/v e temperatura de 25°C), foram realizados estudos de extração de óleo da microalga *Scenedesmus obliquus* dispersos em fase aquosa com acetato de etila e o rendimento foi comparado com misturas de solventes de referência hexano: etanol (1:1 v/v) e clorofórmio: metanol (1:2 v/v). Este conseguiu levar a um rendimento de extração de 100%, enquanto que os outros solventes estudados levaram a rendimentos iguais, considerando as duas extrações e o óleo modelo e o de microalga. A extração de lipídios também foi realizada a partir da biomassa da microalga contendo (17,45 ± 0,0025) %, de óleo, em fase úmida, rompida e não rompida, com 10% de sólidos em suspensão aquosa. O desempenho da extração de óleo da microalga com acetato de etila foi comparado com misturas de solventes, em que clorofórmio: metanol (2:1 v/v) resultou em maior rendimento já no primeiro estágio, enquanto que o acetato de etila e a mistura de hexano: etanol (1:1 v/v) resultaram nos mesmos rendimentos acumulado em dois estágios de extração. Uma análise comparativa de um processo de extração de óleo da biomassa em dois estágios foi realizada para o acetato de etila e as misturas de clorofórmio: metanol e hexano:etanol, considerando a recuperação dos solventes com afinidade a fase aquosa (refinado), como etanol e metanol. Por meio dos resultados dos balanços de massa e energia, verificou-se o consumo de energia é fortemente dependente da

recuperação dos solventes polares na fase aquosa, o que viabiliza o uso do acetato de etila, que não requer recuperação devido a sua baixa solubilidade em água. Adicionalmente, destaca-se que o uso do acetato de etila confere um caráter renovável ao processo de extração e óleo, visto que não se utiliza solventes tóxicos e não renováveis, como metanol, hexano e clorofórmio.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas vêm sendo estudadas como matérias-primas para a produção de biocombustíveis, uma vez que há o constante aumento do preço do petróleo, que é um recurso finito, e a preocupação com os impactos ambientais provenientes das emissões gasosas têm motivado a busca de fontes renováveis. Essa constatação é consequência de inúmeras vantagens quando comparadas com outras fontes de lipídios como: não competem com a produção de alimentos, utilizam áreas de cultivo inadequadas a agricultura tradicional, necessitam de uma pequena área para serem produzidas e apresentam uma produtividade em óleo superior a das plantas oleaginosas (SILVA; BACHOLSKY; JERÔNIMO, 2015). Além disso, a taxa de conversão (L/ha) em óleo das diferentes matérias-primas em biodiesel é: microalgas (91%); palma (3%); coco (1,5%); abacate (1,4%); pinhão manso (1,2%); canola (1%) (YIN et al., 2020). O que mostra que a microalga, quando comparada às outras matérias-primas, produz muito mais óleo.

Apesar de todas as vantagens das microalgas, a extração de óleo é uma etapa do processo de obtenção de biodiesel que é complexa e ainda muito estudada. Após o cultivo e subsequente colheita, as microalgas podem conter elevado teor de água (70 % em massa ou mais) sendo, portanto, difícil para solventes orgânicos apolares, como o hexano, penetrar na barreira da água para extrair lipídios intracelulares. Para superar esse problema, o processo de extração de lipídios é realizado em duas etapas: pré-tratamento celular e recuperação de lipídios, usualmente com solventes orgânicos. Vale ressaltar que, embora o processo de secagem acarrete em um alto rendimento de extração, consome mais energia e resulta em um balanço energético deficiente (KWAK *et al.*, 2019). Chew et al. (2017), Moreno-Garcia et al. (2017), e Roux, Lamotte e Achard (2017) sugerem a utilização da biomassa úmida para extração de lipídios e demais compostos da microalga que possuem alto valor agregado e que podem ser sensíveis à elevação da temperatura. Ao extrair compostos dispersos ou

solubilizados em fase aquosa, o solvente escolhido deve formar fase e conseguir se solubilizar parcialmente na fase aquosa para extrair os lipídios solvatados.

Um dos métodos empregados para a extração de lipídios da biomassa úmida é a extração líquido-líquido, que se refere a uma operação unitária de separação de componentes que apresentam diferença de solubilidade nas duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis que compõem o sistema. A separação ocorre devido ao contato com um solvente insolúvel que irá dissolver, de forma preferencial, um ou mais componentes da mistura e depende da diferença da distribuição dos componentes entre as fases. Dessa forma, se faz necessário um estudo de seleção dos solventes a serem empregados para uma extração mais efetiva. Uma fase será representada pela solução de alimentação, enquanto a outra será pelo solvente de extração a ser empregado. A transferência de massa do soluto ocorre da solução de alimentação para a fase solvente (FRANK et al., 2008).

Alam *et al.* (2019) realizaram a extração de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris* por meio do método TPP (particionamento trifásico) que apresentava duas etapas: incubação e extração. Cada teste continha 50% de suspensão, e o restante do volume compreendia aos solventes: etanol (E), acetato de etila (AE), AE:E nas razões 0,5, 1, 1,75 e 3 (v/v) e AE:E+DKP (ácido 2,5-piperazinadiona-1,4-diacético) nas razões de 2,5, 1,5, 1, 0,7 e 0,4 (v/v). O tempo de incubação foi de 2 h e o de extração variou de 30 min a 240 min. O sistema TPP foi mantido em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C). No sistema que empregava apenas o acetato de etila como solvente o rendimento de lipídios foi de 13,38%, sendo o maior rendimento (93,45%) apresentado pela mistura de solvente AE:E (1:1 v/v).

O acetato de etila pode criar a fase binária com água e ajuda a minimizar a inibição da água durante a reação e é altamente seletivo para lipídios neutros (TRIVEDI; ATRAY; AGRAWAL, 2020). Entretanto, segundo Balasubramanian, Yen Doan e Obbard (2013), o acetato de etila não é recomendado como solvente para extração de lipídios, uma vez que absorve umidade rapidamente e é potencialmente explosivo. Lu, Wang e Yuan (2015) extraíram lipídios neutros da microalga *Chlorella sp* empregando os seguintes solventes: tolueno, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol e n-hexano. Destes o acetato de etila levou a uma excelente seletividade na extração de lipídios neutros, sendo essa significativamente maior do que a de clorofórmio. O hexano extraiu o menor teor de lipídios entre os seis solventes. Em outro estudo do mesmo autor, Lu et al. (2016) conseguiram com a mistura de solventes acetato de etila e etanol (1: 1 v/v) extraíam 4,75% de lipídio, o que corresponde a um rendimento de aproximadamente 65%. Trivedi, Atray e Agrawal (2020)

estudaram a extração lipídios de *Scenedesmus obliquus* CCAP 276 / 3A com alta carga de sólidos de 15% (m/v) em dois estágios usando solventes imiscíveis em água: acetato de etila e clorofórmio, dessa forma obtiveram uma eficiência de extração de $33 \pm 1,09\%$.

A análise de viabilidade de extração de lipídios de microalgas depende de inúmeros fatores, como tempo de extração, volumes relativos das fases e consumo de energia utilizando não somente na extração, mas, sobretudo na recuperação dos solventes e concentração do produto de interesse, ou seja, os lipídios. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo minimizar o número de estágios de extração, o volume relativo entre solvente e suspensão aquosa de biomassa, e a demanda por energia na concentração dos lipídios e na recuperação dos solventes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados neste estudo são apresentados nessa seção. Acetato de etila (CAS número 141-78-6) da marca Química Moderna. Água deionizada. Clorofórmio (CAS número 67-66-3) da marca Vetec com pureza de 99,8%. Hexano (CAS número 110-54-3) da marca Química Moderna. Álcool etílico (CAS 64-17-5) da marca Qhemis. Metanol (CAS número 67-56-1) da marca Dinâmica. Óleo comercial de palma da marca Cepera, óleo comercial de Chia da marca Giroil e óleo comercial de Coco da marca Natural Life. A linhagem da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 utilizada pertence à coleção de cultura de microalga e cianobactéria da Universidade Federal de Viçosa, mantida no Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola.

2.2 Seleção de solventes

Realizaram-se dois ensaios preliminares a fim de verificar se era possível a extração de lipídios das microalgas apenas com acetato de etila e qual o melhor método para romper as células e permitir a interação com o solvente. Destaca-se que o ensaio proposto não objetiva uma nova técnica de quantificação de lipídios, como os métodos de Folch et al. (1957), Bligh e Dyer (1959) e J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). No primeiro ensaio, 1 g de biomassa foi pesado em balança analítica de precisão 0,01 mg (AUW220D, Shimadzu, Japão). A essa massa foi adicionado 4 mL de solução de H₂SO₄ a 2% (v/v) em tubos plásticos de 50 mL. As amostras foram dispostas em autoclave (Autoclave Vertical CS) por 15 min a 121°C para o rompimento químico (ácido).

Após o resfriamento, a mistura foi neutralizada até pH 6 com solução de NaOH 50% (m/m). Já no segundo ensaio de rompimento, pesou-se 1 g de biomassa macerada em graal e pistilo por 5 minutos em tubos de 50 mL e adicionou-se 4 mL de água deionizada.

Posteriormente, foram adicionados diferentes volumes de solventes (acetato de etila e hexano) conforme a Tabela 4.1. Os tubos contendo as amostras rompidas com H₂SO₄ foram submetidos à agitação pelo sistema de tamboramento rotativo a 550 rpm durante 6 horas, enquanto as amostras submetidas ao rompimento mecânico foram agitadas por 12 horas. Após a extração, as amostras foram centrifugadas (Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, Estados Unidos) a 7500 × g por 10 min. O sobrenadante (fase apolar) foi transferido para frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL, previamente secos e de massas conhecidas. Os solventes foram submetidos a evaporação e os frascos foram dispostos em estufa (MA035, Marconi, Brasil) a 65 °C por 15 horas e novamente pesados. Os ensaios foram realizados em 3 repetições.

Tabela 4.1: Valores de hexano e acetato de etila empregados nos ensaios preliminares.

Ensaio	Hexano (ml)	Acetato de etila (ml)
A	10	10
B	0	20
C	20	0
D	5	5
E	2,5	2,5

Fonte: A autora.

2.3 Preparo do óleo para estudo

Como o óleo bruto de microalga apresenta composição complexa e escura empregou-se uma mistura de óleos comerciais tendo como base a composição de ácido graxo do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*. A mistura de óleos usada como matéria-prima no estudo continha óleos de palma (65% m/m), chia (20% m/m) e coco (15% m/m). Como os óleos comerciais apresentam baixo teor de acidez (menos de 3%) e o da microalga em torno de 40%, adicionou-se ácido graxo produzido conforme Barcelos et al (2018) ao óleo modelo a fim de o mesmo apresentar um teor de acidez próximo a 40% e determinou-se a acidez titulável segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008).

Para mostrar a complexidade do óleo de microalga frente aos óleos comerciais e ao ácido graxo livre realizou-se a cromatografia em camada delgada conforme metodologia adaptada de Yao et al., 2015.

2.4 Determinação do tempo de extração

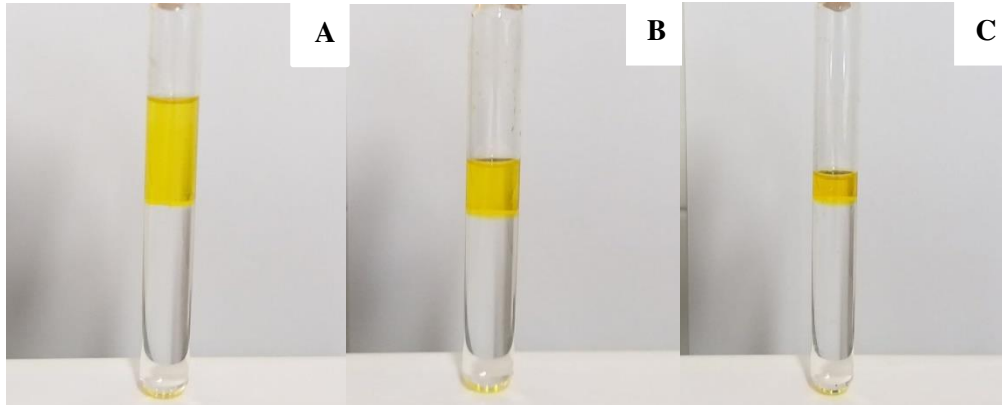
Aos tubos tipo Eppendorf's, previamente secos em estufa e pesados, adicionou-se 100 μL de óleo modelo e 900 μL de água, agitou-se em vórtex e adicionou-se 250 μL de acetato de etila e, novamente, realizou-se a agitação em vórtex. Os tubos foram dispostos em tamboramento rotativo por 1, 2 e 4 h. Após esses tempos, centrifugou-se a $5000 \times g$ por 2 min e realizou-se a separação das fases com a extração da fase aquosa (inferior) com pipeta de vidro Pasteur. Após essa etapa, os eppendorf's com as fases acetato (superior) e aquosa foram para secagem na estufa a 105°C . Após a evaporação completa de água e acetato de etila os tubos foram pesados para a quantificação da massa de óleo final e determinação do tempo de tamboramento mais indicada.

2.5 Teste de carga

Três cargas diferentes de acetato de etila foram testadas em três estágios de extração e em três temperaturas diferentes: 25, 35 e 45°C . As cargas testadas foram definidas pela razão entre volume de solvente e suspensão aquosa de óleo modelo a 1% (v/v), nas proporções de 1:10, 1:4 e 1:2 (Figura 4.1). É importante destacar, que foi empregado 1% de óleo, uma vez que na extração de óleo de biomassa úmida, emprega-se uma suspensão com 10% de sólidos que proporciona 1% de óleo. As cargas utilizadas foram formuladas contendo:

- 1:2 - 5 mL de acetato de etila: 10 mL de suspensão aquosa;
- 1:4 - 2,5 mL de acetato de acetato de etila: 10 mL de suspensão aquosa; e,
- 1:10 - 1 mL de acetato de etila: 10 mL de suspensão aquosa.

Figura 4.1: Separação de fases do sistema contendo acetato de etila e suspensão aquosa com 1% (m/m) de óleo modelo a 40% AGL nas proporções em volume de (A) 1:2; (B) 1:4; (C) 1:10.



Fonte: A autora.

As misturas nas cargas pré-estabelecidas foram adicionadas a tubos plásticos de 15 mL e dispostas a extração por tamboramento durante 1 h, uma vez que esse tempo foi adequado conforme experimento realizado apresentado no item 2.4. Após esse tempo, o tubo foi disposto em centrífuga a $5000 \times g$ por 5 minutos, para que as fases pudessem ser separadas. Após a separação das fases, a fase aquosa foi coletada com pipeta de Pasteur de vidro e disposta em um novo tubo. A fase superior que ficou no tubo foi submetida à evaporação sendo quantificada a massas de óleo, representando assim o primeiro estágio de extração.

Ao tubo contendo a fase aquosa, adicionou-se a mesma quantidade acetato de etila puro que foi utilizada na extração anterior, sendo submetida às mesmas etapas utilizadas da extração anterior. Esse procedimento foi repetido até que não houvesse mais óleo na fase aquosa para ser extraído, sendo três extrações realizadas no total. As massas de óleo de topo foram quantificadas diretamente para cada estágio de extração, e por balanço de massa, a massa de óleo não recuperada foi calculada.

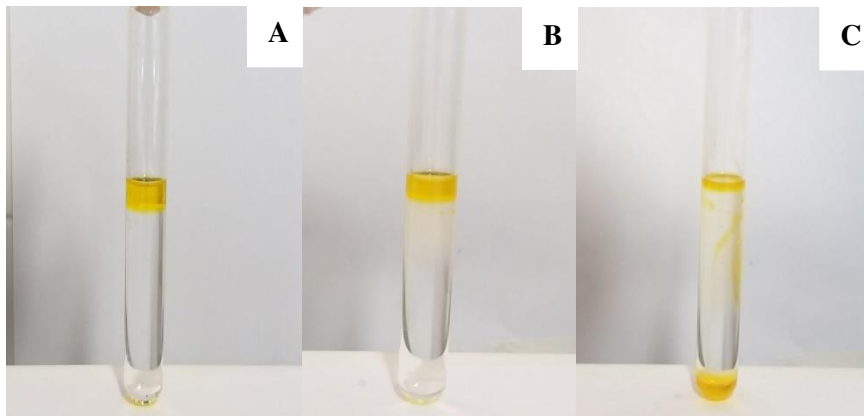
2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média dos valores \pm desvio padrão. As médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

2.7 Ensaio de validação

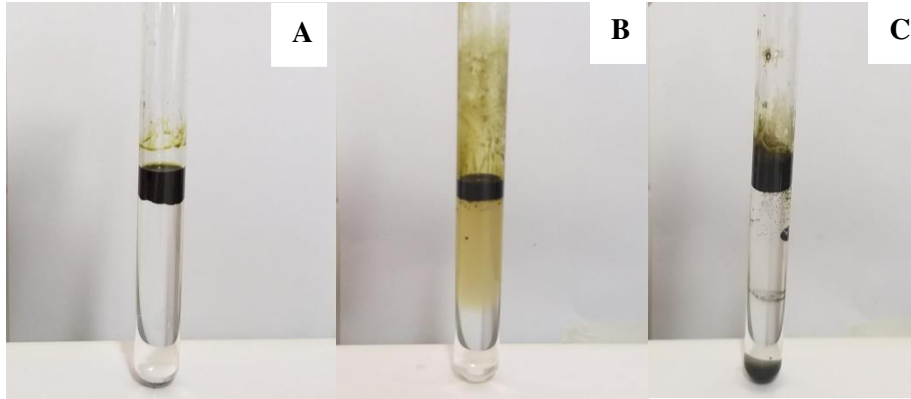
Após obtenção da condição ótima (carga e número de estágios que levem ao maior rendimento com menor quantidade de solvente) que corresponde a carga 1:10 v/v e 2 estágios de extração, foi realizado um estudo comparativo de extração do óleo modelo com o óleo de alga, usando duas misturas de solvente de referência (etanol: hexano na proporção de 1:1 v/v e metanol: clorofórmio a 2:1 v/v), na temperatura de 25 °C. Foram realizadas extrações do óleo modelo a 40% AGL (Figura 4.2) e do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus* (Figura 4.3) com acetato de etila, e as misturas de solvente de referência. Como respostas desse experimento, foi obtido o rendimento de extração, K_{LN} e o K_{AGL} e seletividade do solvente. Esse ensaio foi realizado seguindo a metodologia proposta no tópico 2.5.

Figura 4.2: Separação de fases na extração do óleo modelo a 40% AGL com carga de solvente: suspensão aquosa a 1% de óleo (m/m) de 1:10 (v/v) com (A) acetato de etila (B) hexano: etanol (1:1 v/v) e (C) clorofórmio: metanol (1:2 v/v).



Fonte: A autora.

Figura 4.3: Separação de fases na extração do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 com carga de solvente: suspensão aquosa a 1% de óleo (m/m) de 1:10 (v/v) com (A) acetato de etila (B) hexano: etanol (1:1 v/v) e (C) clorofórmio: metanol (1:2 v/v).



Fonte: A autora.

Os coeficientes de partição dos lipídios neutros (K_{LN}) e do AGL (K_{AGL}), assim como a seletividade do solvente (S) tanto para o óleo modelo estudado como para o óleo bruto da *Scenedesmus obliquus*, foram calculados a partir das frações mássicas de lipídios neutros e AGL nas fases extrato e refinado, utilizando-se as equações 1, 2 e 3.

$$K_{AGL} = \frac{w_{AGL}^t}{w_{AGL}^b} \quad (1)$$

$$K_{LN} = \frac{w_{LN}^t}{w_{LN}^b} \quad (2)$$

$$S = \frac{K_{AGL}}{K_{LN}} \quad (3)$$

em que w_{AGL}^t e w_{AGL}^b são a fração mássica do AGL no topo e base, respectivamente, w_{LN}^t e w_{LN}^b a fração mássica do LN no topo e base, respectivamente.

2.8 Ensaio com biomassa úmida

Realizou-se também um estudo de extração de lipídios com biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus*, rompida (método mecânico) e não rompida, dispersa em água (10% de sólidos em água), perfazendo 10 mL de suspensão, sendo adicionado 1 mL de acetato de etila. A partir desse teor de sólidos, obtém-se um teor de óleo disperso em água próximo a 1% em massa. Dessa forma, as diferenças entre os parâmetros de desempenho da extração indicam os

efeitos adversos dos outros conteúdos celulares na separação de fases e particionamento dos lipídios neutros nas fases extrato e refinado. Tubos plásticos de 15 mL contendo a suspensão de biomassa e solvente foram submetidos à extração por tamboramento por 1 h a 25 °C. Após esse tempo os tubos foram centrifugados a 10000 g por 5 min, realizou-se a extração de lipídios e evaporação do solvente. Repetiu-se esse procedimento adicionando-se mais 1 mL de acetato de etila e até que o máximo de lipídios fosse extraído. Para esse experimento, também foi empregado os solventes hexano: etanol (1/1 v/v), clorofórmio: metanol (1:2 v/v) a fim de comparar os rendimentos obtidos em cada estágio de extração, a demanda energética de remoção e perda de solventes.

A carga de solvente específica (CSI), energia intensiva (EI) sem recuperação de metanol, etanol e acetato de etila e a energia intensiva (EI) com recuperação de acetato de etila, metanol e etanol foram calculadas utilizando-se as equações 4, 5 e 6, respectivamente.

$$CSI = \frac{m_s}{m_o} \quad (4)$$

$$EI \text{ (sem recuperação)} = \frac{E_E}{\eta} \quad (5)$$

$$EI \text{ (com recuperação)} = \frac{EE_{SR} + E_R}{\eta} \quad (6)$$

em que m_s e m_o são as massas de solvente e óleo (kg), respectivamente, E_E e E_R são energia de evaporação e energia de recuperação (MJ), respectivamente, e η é o rendimento da extração. EE_{SR} é a energia intensiva (sem recuperação).

Para o cálculo da energia intensiva (sem recuperação), levou-se em consideração a energia necessária para evaporar e/ou aquecer os compostos que saíram do evaporador, enquanto que para energia intensiva (com recuperação), levou-se em conta a energia necessária para evaporar e/ou aquecer os compostos que ficaram na fase refinado, após passarem pelo segundo extrator.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Seleção de técnicas de rompimento celular para a extração de lipídios

Pelos resultados apresentados na Tabela 4.2, pode-se perceber que para as condições na qual só se tinha apenas um solvente, a diferença no tempo de extração e do pré-tratamento não levaram a uma diferença estatisticamente significativa. Além disso, observou-se que o maior teor de lipídios totais extraídos foi obtido no Ensaio B, onde foi utilizado apenas o acetato de etila como solvente.

Tabela 4.2: Teor de lipídios encontrados nos ensaios de seleção de solventes e tipo de rompimento (RA – ácido, RM - Mecânico). Letras iguais para uma mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a um nível 5 % de significância.

Ensaio	Teor de lipídios (% m/m)		Rendimento (%)			
	RA	RM	Bligh-Dyer		J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff	
	RA	RM	RA	RM	RA	RM
A	5,35 ± 0,001 ^a	3,26 ± 0,004 ^b	52,76	32,15	31,40	19,13
B	6,67 ± 0,001 ^a	6,46 ± 0,008 ^a	65,78	63,71	39,14	39,91
C	1,54 ± 0,002 ^a	1,75 ± 0,001 ^a	15,19	17,26	9,04	10,27
D	3,81 ± 0,002 ^a	1,80 ± 0,002 ^b	37,57	17,75	22,36	10,56
E	2,32 ± 0,07 ^a	1,74 ± 0,002 ^b	22,89	17,16	13,62	10,21

Fonte: A autora.

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 4.2, selecionou-se o acetato de etila como único solvente de extração, pois sua utilização resultou em maior teor de lipídios extraído e permite extrair o composto alvo com menor custo. A utilização de apenas um solvente em conjunto com o método de rompimento mecânico permitiu extrair lipídios com mesmo rendimento (ensaio B) quando comparado com o rompimento ácido, e com a vantagem de ser mais preservativo aos demais metabólitos contidos na biomassa.

É importante destacar que a seleção do solvente apropriado para a extração de lipídios é uma etapa complexa devido ao tipo de lipídio, a composição da fração polar e apolar de lipídios nas células de microalgas, a polaridade do solvente orgânico, a estrutura complexa da parede celular da microalga e permeabilidade do solvente na membrana das células da

microalga para liberar os lipídios. A extração por solvente orgânico é amplamente utilizada devido ao baixo custo e ao método de operação que é simples (WU *et al.*, 2017).

Além disso, a fim de aumentar a extração / recuperação de lipídios deve-se aumentar a polaridade do solvente, para tal, realiza-se a mistura de solventes polares e não polares. Isso se deve à capacidade dos solventes polares de liberar os lipídios de seus complexos de proteína-lipídio, o que facilita sua dissolução no solvente apolar. Ao extrair / recuperar de lipídios de biomassa úmida esse efeito será ainda maior, pois o solvente polar penetra camada de água e tornar os lipídios disponíveis para solvatação apolar. Por isso, normalmente, se empregam mistura de solventes para extração de lipídios de microalga e, com isso empregou-se a mistura acetato de etila e hexano, a fim de saber se apenas o acetato de etila seria eficiente para extração de lipídios ou se precisaria do hexano (GHASEMI NAGHDI *et al.*, 2016).

Com o exposto, o acetato de etila foi escolhido como solvente, já que levou ao maior teor de lipídios extraídos e tem algumas vantagens em relação aos outros solventes, como: baixa temperatura de ebulição (77,1 °C), que requer menos energia em sua recuperação por evaporação; baixo custo de obtenção e renovável, já que é sintetizado a partir do etanol e apresenta similaridade com o composto alvo. Além disso, em relação ao clorofórmio que é um organoclorado tóxico, o acetato pode atuar como um reagente próprio para a transesterificação com lipídios, já que é miscível com estes e facilita a transferência de massa de lipídios para etanol que é gerado como um dos produtos de hidrólise de acetato de etila sob condições ácidas (PARK *et al.*, 2017).

A diferença encontrada nos teores de lipídios nos ensaios de extração pode ser justificada pelo tempo de extração no sistema, que utilizou uma agitação branda visando evitar a formação de emulsões. Nassef *et al.* (2019) empregaram uma amostra de 500 mL de *Scenedemus quadricauda* na extração de lipídios, variando a potência do micro-ondas de 180 a 600 W, o tempo de pré-tratamento de 2 a 8 min e o tempo de extração de 3 a 4 h. Como ponto ótimo usando a modelagem difusa PSO (Otimização de Exame de Partícula) 62,97 % de lipídios extraídos ao usarem uma potência igual a 672,51 W, 10 minutos de aquecimento e 4,18 h de extração. Logo, verifica-se que as condições utilizadas condições de extração mais agressivas são necessárias para obter-se um maior rendimento.

Na Tabela 4.2, é apresentado o rendimento da extração em relação aos valores obtidos na caracterização por Bligh e Dyer (1959) e J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). A partir desses valores, é possível

verificar que os rendimentos foram baixos indicando que não foi possível extrair os lipídios em sua integralidade. Isso pode ser explicado pelo fato de nos cinco ensaios só foi realizada uma única extração, enquanto que nos métodos de caracterização por Bligh e Dyer (1959) e J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986) foram realizadas 5 extrações sucessivas e com elevada carga de solventes em relação a quantidade de amostra.

3.2 Teste de carga e avaliação do tempo de extração

Pelos resultados da Tabela 4.3 e pelo teste de comparação de médias a um nível de confiança de 95%, pode-se concluir que o tempo de extração com agitação no sistema de tamboramento não é estatisticamente significativo. Dessa forma, procedeu-se o experimento de teste de carga empregando o tempo de 1 h.

Tabela 4.3: Massa de óleo modelo extraída em diferentes tempos de agitação em tamboramento rotativo. Letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a um nível 5 % de significância.

Tempo de extração	Massa de óleo extraída
1 hora	0,085 ± 0,008 ^a
2 horas	0,086 ± 0,007 ^a
4 horas	0,083 ± 0,003 ^a

Fonte: A autora.

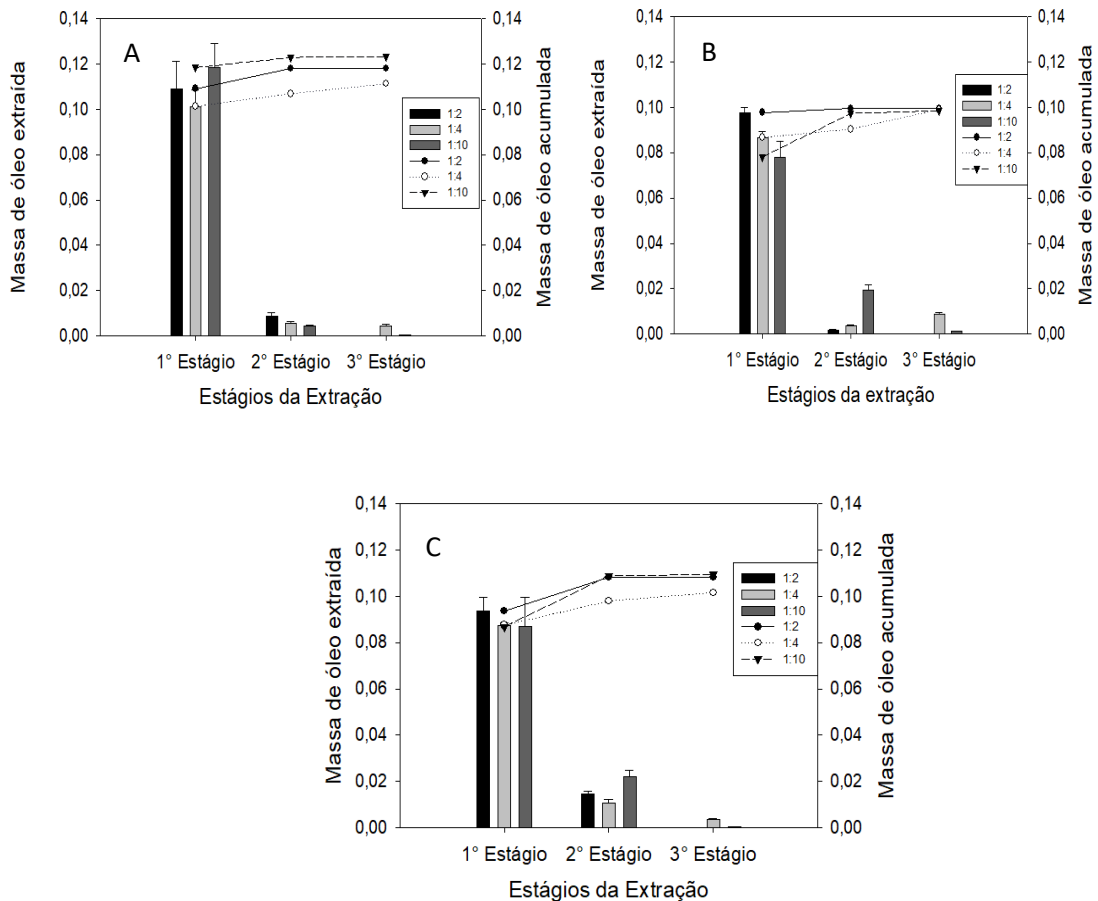
Após serem retirados os tubos contendo a mistura ternária do sistema de agitação por tamboramento, a separação das fases ocorre de forma instantânea. Dessa forma, a fase extrato (superior) é rica em óleo e acetato de etila e a fase refinado (inferior) contém água em maior proporção.

3.3 Teste de carga

Com base nos resultados apresentados na Figura 4.5, é possível verificar que dois estágios de extração são suficientes para a extração do óleo, pois a massa de óleo no terceiro estágio é muito pequena. Especificamente para a carga 1:2 (v/v), a massa de óleo no terceiro estágio de extração não pode ser quantificada. Ainda por meio da Figura 4.5, verifica-se que

as quantidades de massa utilizadas nesse experimento são adequadas, pois permitiram a quantificação das massas de óleo extraídas acima da precisão da balança utilizada (0,01 mg).

Figura 4.4: Resultados obtidos pelo teste de carga com acetato de etila e suspensão aquosa de 1% de óleo nas proporções de 1:2, 1:4 e 1:10 (v/v) nas temperaturas de (A) 25, (B) 35 e (C) 45°C.



Fonte: A autora.

Na Tabela 4.4 é apresentado o rendimento acumulado para cada uma das três cargas estudadas nas três temperaturas. É possível constatar que dois estágios de extração permitem extrair mais de 91 % da massa de óleo inicial. Dessa forma, procedeu-se com os experimentos posteriores realizando apenas dois estágios de extração.

Tabela 4.4: Rendimento de extração acumulado em função de diferentes cargas de acetato de etila e suspensão aquosa de 1% de óleo e temperaturas.

Carga (v/v)	Rendimento Acumulado (%)		
	1° Estágio	2° Estágio	3° Estágio
25°C			
1:2	92,5 ± 1,70	100 ± 1,70	
1:4	91,0 ± 0,30	96,0 ± 0,40	100,0 ± 0,70
1:10	96,1 ± 0,40	99,7 ± 0,40	100,0 ± 0,00
35°C			
1:2	98,3 ± 0,30	100 ± 0,30	
1:4	87,5 ± 1,00	91,2 ± 0,40	99,9 ± 0,90
1:10	79,3 ± 2,90	98,8 ± 2,8	100 ± 0,000
45°C			
1:2	86,3 ± 0,60	100 ± 0,60	
1:4	86,0 ± 0,70	96,3 ± 1,20	99,9 ± 0,50
1:10	79,9 ± 1,40	99,5 ± 1,40	100 ± 0,10

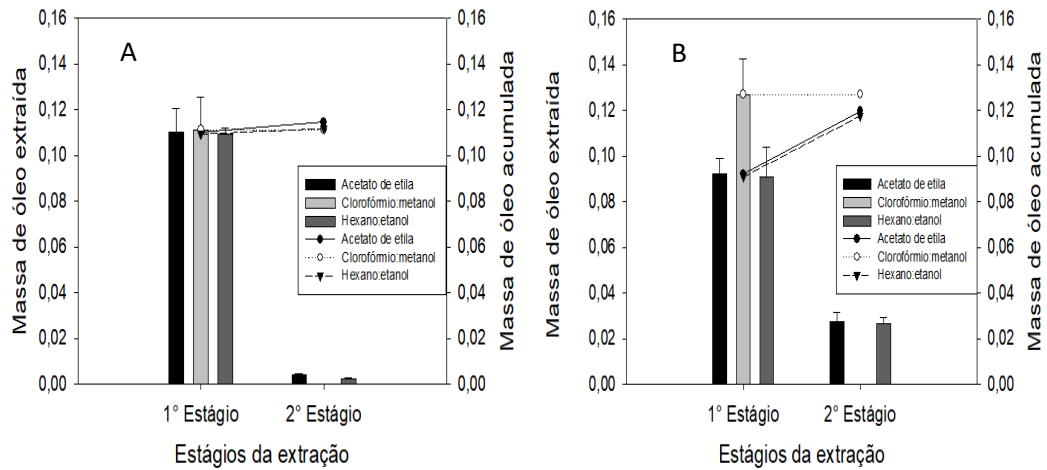
Fonte: A autora.

3.4 Ensaio de validação

Para a realização do ensaio de validação, foram consideradas as condições verificadas no teste de carga apresentado na seção anterior. Com isso, o tempo de agitação no sistema de extração com agitação por tamboramento foi de 1 h e a carga empregada foi de 1:10 (v/v) com suspensão de 1% (m/m) de óleo em água na temperatura de 25°C. Além disso, foi comparado o desempenho da extração entre o óleo modelo e o óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*, assim como o efeito do tipo de solvente: acetato de etila e as misturas de solventes clorofórmio: metanol (1:2 v/v) e hexano: etanol (1:1 v/v).

Pelos resultados apresentados na Figura 4.6 é possível verificar que a mistura de clorofórmio e metanol é capaz de extrair todo óleo já no primeiro estágio de extração (óleo modelo e da microalga em estudo). Para o óleo modelo, o acetato de etila e as misturas clorofórmio: metanol (1:2 v/v) e o hexano: etanol (1:1 v/v) extraíram quantidades de massa estatisticamente iguais, no primeiro estágio, enquanto no segundo estágio a massa extraída pelo acetato de etila foi maior, embora as massas acumuladas extraídas pelos três solventes foram iguais. Já para o óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*, a mistura clorofórmio: metanol (1:2 v/v) se mostrou o mais eficiente, enquanto o acetato de etila e a mistura hexano: etanol (1:1 v/v) resultaram em mesma massa acumulada (estatisticamente iguais) para dois estágios de extração.

Figura 4.5: Efeito dos solventes e número de estágios do desempenho da extração do (A) óleo modelo e (B) óleo de *Scenedesmus obliquus* dispersos em água a 1% (m/m).



Fonte: A autora.

Pela Tabela 4.5, é possível observar pelos valores de rendimento acumulado que só no primeiro estágio é possível extrair mais de 96 % da massa inicial de óleo e no segundo estágio se extrai mais de 99 % da massa inicial. Entretanto, para o óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*, é possível extrair pelo menos 73,6 % e 85,2 % com uma e duas extrações, respectivamente. Embora a mistura de solventes clorofórmio: metanol apresenta maior eficiência de extração, é importante destacar que os solventes são tóxicos e são obtidos de fontes não renováveis. Entretanto, o uso do acetato de etila permitiu extrair o óleo de microalgas disperso em água com a mesma eficiência da mistura etanol:hexano. Esse resultado implica em uma possibilidade de substituição não só de um solvente proveniente de fontes não renováveis (hexano), mas ainda um solvente (etanol) que, embora renovável, se particiona preferencialmente na fase refinado (rica em água), o que implica em maiores custos para sua reutilização.

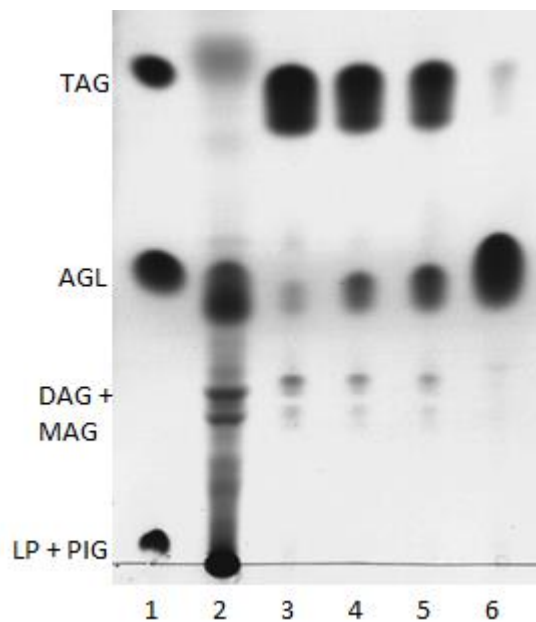
Tabela 4.5: Rendimento de extração acumulado em função dos solventes e número de estágios e suspensão aquosa de 1% de óleo modelo e de óleo de *Scenedesmus obliquus*.

Solvente	Rendimento Acumulado (%)			
	Óleo modelo		Óleo de <i>S. obliquus</i>	
	1º Estágio	2º Estágio	1º Estágio	2º Estágio
Acetato de etila	96,4 ± 0,40	99,7 ± 0,40	74,0 ± 1,05	96,0 ± 2,10
Clorofórmio: metanol	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
Hexano: etanol	97,5 ± 1,20	99,6 ± 0,20	73,6 ± 8,50	95,2 ± 1,50

Fonte: A autora.

A diferença nos resultados de rendimento de extração de óleo é explicada pelo fato do óleo modelo ser majoritariamente neutro, enquanto o de microalga é mais complexo com uma fração de lipídios polares, pigmentos e outros compostos que pode ser verificado no ensaio de cromatografia em camada delgada (Figura 4.7). Por meio desse ensaio, é possível observar que o óleo de microalga apresenta uma quantidade significativa de lipídios polares, pigmentos, mono e diacilglicerol quando comparado aos demais óleos e ao ácido graxo livre e uma quantidade pequena de triacilglicerol ao ser comparado com o óleo modelo em diferentes teores de acidez. Além disso, vemos que o TAG vai diminuindo conforme o teor de AGL vai aumentando.

Figura 4.6: Placa de sílica resultante da cromatográfica em camada delgada. 1= padrão, 2=óleo bruto da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, 3=óleo modelo a 2 % AGL, 4=óleo modelo a 20 % AGL, 5=óleo modelo a 40 % AGL e 6=AGL. LP = lipídios polares; PIG = pigmentos; MAG e DAG = Mono e diacilglicerol; AGL = ácidos graxos livres; TAG = triacilglicerol.



Fonte: A autora.

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores de coeficiente de partição do AGL e do LN e a seletividade tanto para o óleo modelo quanto para o óleo da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 que foram extraídos com acetato de etila, clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e para hexano: etanol (1:1 v/v).

Tabela 4.6: Coeficiente de partição de AGL, LN e seletividade para o óleo modelo com 40% AGL e o da microalga *Scenedesmus obliquus* com acetato de etila, clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e hexano: etanol (1:1 v/v) a 25 °C.

Solvente	Óleo modelo						Óleo de <i>Scenedesmus obliquus</i>					
	1° Estágio			2° Estágio			1° Estágio			2° Estágio		
	K _{AGL}	K _{LN}	S	K _{AGL}	K _{LN}	S	K _{AGL}	K _{LN}	S	K _{AGL}	K _{LN}	S
Acetato de etila	7,44	1,17	6,37	5,10	1,12	4,55	14,09	1,13	12,41	2,69	1,53	1,76
Clorofórmio: metanol	25,85	5,54	4,66				22,61	5,77	3,92			
Hexano: etanol	4,24	1,01	4,20	3,98	1,21	3,29	11,34	1,68	6,75	1,66	1,21	1,37

Fonte: A autora.

Gonçalves et al. (2020) realizaram a desterpenação do óleo essencial de alecrim modelo composto pelos principais componentes encontrados no petróleo bruto: α -pineno (1), eucaliptol (2) e cânfora (3). Naquele estudo, foram utilizadas misturas de etanol e água a 298,2 K e a pressão atmosférica, obtendo-se dados de equilíbrio líquido-líquido. Dessa forma, em relação ao coeficiente de distribuição e seletividade, concluíram que a água diminui a solubilidade das fases, mas o etanol aumenta tanto a solubilidade dos componentes (α -pineno, eucaliptol e cânfora) na fase solvente e do solvente na fase terpeno, logo uma maior quantidade de água no solvente (ou menor composição de etanol) está associada com menor K_i , o que leva a maiores valores de S_{ij} . Pelo diagrama de equilíbrio que foi obtido pelo trabalho, observa-se que a cânfora (3) possui maior afinidade com o solvente do que o eucaliptol (2), portanto $K_3 > K_2$ e $S_{3/1} > S_{2/1}$ para ambos os solventes.

Shiozawa et al. (2020) obtiveram dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido e realizaram a modelagem termodinâmica (NRTL) de sistemas compostos de óleo refinado (soja, caroço de algodão e farelo de arroz), mistura comercial de acilgliceróis parciais (MAG e DAG), ácidos graxos livres (AGL), ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) e etanol nas temperaturas de 303,2 e 318,2 K. Por meio dos valores de coeficiente de partição encontrados para AGL, os autores concluíram que houve uma preferência do AGL em migrar pela fase rica em solvente. Pelos dados apresentados na Tabela 4.6, verifica-se o AGL se distribui majoritariamente na fase solvente, uma vez que os valores para K_{AGL} foram bem maiores que para os lipídios neutros. Além disso, vê-se que o K_{AGL} diminui do primeiro para o segundo estágio, uma vez que como maior parte do AGL migrou para a fase rica em solvente no primeiro estágio.

3.5 Efeito dos componentes celulares da biomassa de microalgas e técnicas de rompimento celular no desempenho da extração

Os rendimentos acumulados obtidos por meio da extração de lipídios da biomassa úmida com os solventes acetato de etila (AE), clorofórmio: metanol (1:2 v/v) (C:M) e hexano: etanol (1:1 v/v) (H:E) são apresentados na Tabela 4.7. Para a obtenção dos rendimentos, empregou-se o teor de lipídios, $(17,45 \pm 0,0025)$ %, obtido pelo método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Devido ao efeito da iteração de outros conteúdos celulares da biomassa de microalgas, como proteínas e carboidratos, junto aos lipídios o desempenho da extração é afetado pela presença desses componentes. Portanto, estendeu-se o número de estágios de extração para 3. Verifica-se que a quantidade de lipídios extraída no terceiro estágio, o teor de lipídios extraído foi baixa, não justificando sua utilização nos balanços de massa e energia. Além disso, como a biomassa rompida levou aos maiores rendimentos, nos três estágios e para todos os solventes empregados, empregou-se a mesma nos balanços de massa e energia.

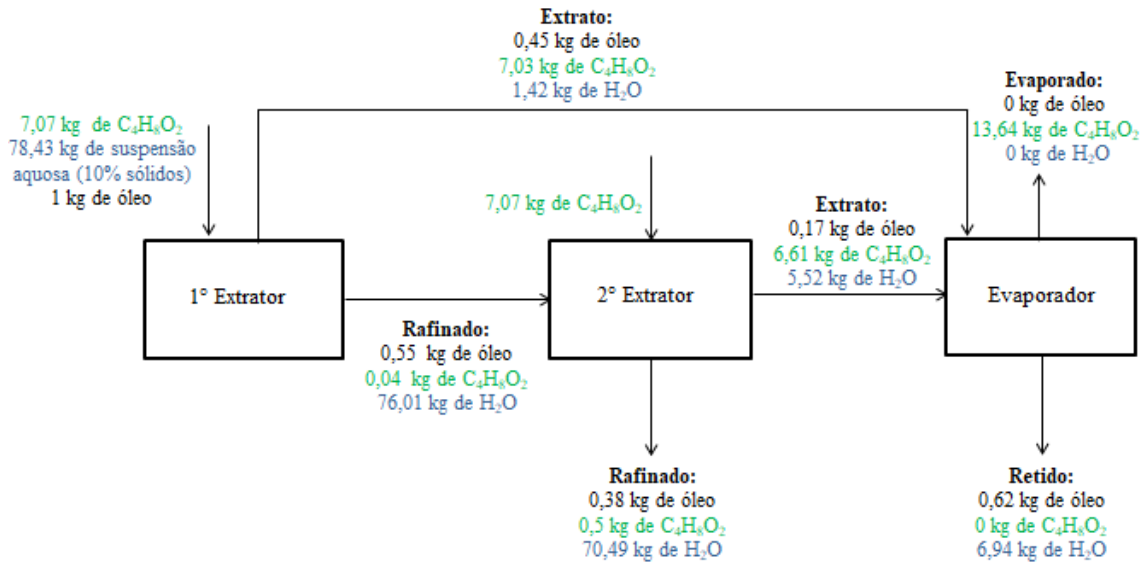
Tabela 4.7: Rendimento acumulado de óleo extraído da biomassa úmida. AE= acetato de etila; C:M= clorofórmio: metanol (1:2 v/v) e H:E= hexano: etanol (1:1 v/v).

Solvente	Rendimento óleo da biomassa não rompida			Rendimento óleo da biomassa rompida		
	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio
AE	26,03 ± 2,54	36,20 ± 4,20	38,07 ± 2,40	44,61 ± 2,22	61,62 ± 5,83	64,68 ± 1,05
C: M	28,63 ± 1,40	42,38 ± 1,30	45,25 ± 1,30	49,52 ± 4,21	71,80 ± 1,90	72,92 ± 0,09
H: E	11,93 ± 1,50	22,73 ± 1,70	24,17 ± 1,46	37,08 ± 6,36	59,32 ± 3,82	61,99 ± 0,46

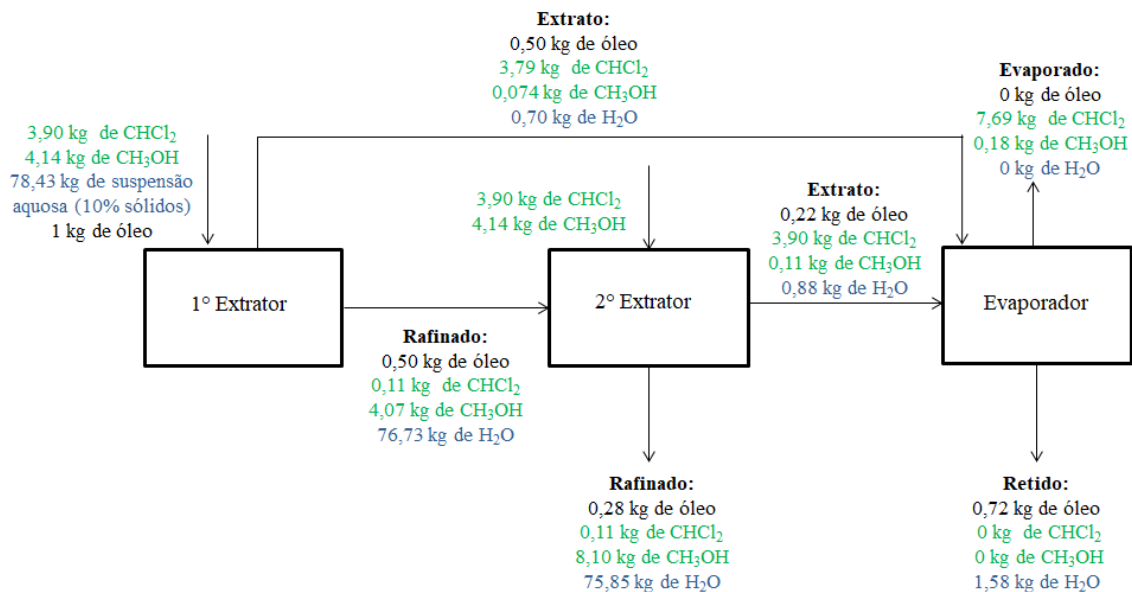
Fonte: A autora.

Para a quantificação da massa de acetato de etila e água referentes ao topo e a base nas duas extrações empregou-se os dados de equilíbrio obtidos no Capítulo 3 referentes ao teor de acidez de 40% e temperatura a 25 °C. A quantificação das massas de hexano, etanol e água foi efetuada a partir dos dados de equilíbrio obtidos por Moriyoshi et al (1988). Para o sistema clorofórmio, metanol e água utilizaram-se os trabalhos de Bligh and Dyer (1959) e Molina Grima, Gonzáles e Giménes (2013).

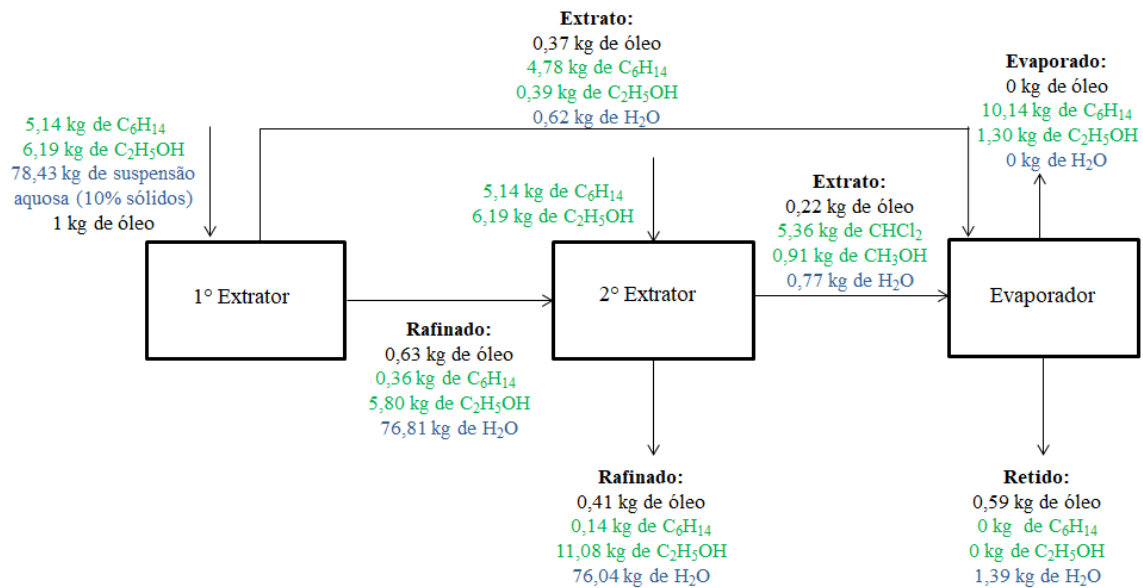
3.5.1 Balanço de massa para sistema biomassa úmida rompida + acetato de etila



3.5.2 Balanço de massa para sistema biomassa úmida + clorofórmio + metanol



3.5.3 Balanço de massa para sistema biomassa úmida + hexano + etanol



Balasubramanian, Yen Doan e Obbard (2013), compararam a extração de lipídios da microalga *Nannochloropsis sp.* ao empregar os seguintes métodos: sonicação, extração acelerada por solvente (ASE), extração de Soxhlet e homogeneização e as seguintes misturas de solventes: clorofórmio: metanol (2:1 v/v), hexano: isopropanol (3:2 v/v), acetato de etila: etanol (3:2 v/v) e diclorometano: etanol (2:1 v/v). Com base nos resultados obtidos, o ASE se mostrou o método de extração de lipídios mais eficiente. Em relação ao hexano, ao ser empregado sozinho apresentou um rendimento muito baixo e ao ser empregado misturado a outro solvente resultou em um rendimento um pouco maior, sendo esse aumento não significativo quando comparado às outras misturas de solventes. A mistura clorofórmio: metanol (2:1 v/v) resultou em maior rendimento de extração, próximo ao obtido pela mistura diclorometano: etanol (2:1 v/v). Essa última mistura apresenta como vantagem, quando comparada a mistura clorofórmio: metanol, uma menor toxidez.

Com o exposto, verifica-se que os resultados encontrados na literatura são coerentes com os obtidos neste trabalho, uma vez que, por meio dos balanços de massa, é possível verificar que a mistura clorofórmio: metanol (1:2 v/v) consegue extrair uma maior quantidade de óleo e, conseqüentemente, a um maior rendimento de extração, sendo seguido pelo acetato de etila e hexano: etanol (1:1 v/v). Além disso, pelo balanço apresentado no item 3.7.1 é possível observar que 38 % de óleo presente na corrente de alimentação não foi extraído e, em relação ao acetato de etila, 0,56% da massa inicial de acetato de etila é perdida para a primeira fase refinado e 7,03% da massa adicionada no segundo extrator é perdida na segunda fase

refinado. Já ao se analisar o balanço do item 3.7.2 verifica-se que a quantidade residual de óleo corresponde a 28 % da alimentação, e quanto ao clorofórmio, perde-se 2,82% da massa adicionada no primeiro e segundo extrator para a fase refinado, enquanto para o metanol o percentual de perda é de 98,31 e 98,66%, para a primeira e segunda fase refinado, respectivamente. No terceiro sistema (item 3.7.3) observa-se a maior perda de óleo na corrente de refinado (41 %), sendo que após a primeira extração perde-se 7,00 e 93,70% de hexano e etanol, respectivamente, para a fase refinado e com segunda extração a perda é de 2,54 e 92,41%, respectivamente.

Na comparação dos três sistemas, a mistura hexano: etanol (1:1 v/v) é a menos recomendada, pois resulta na menor recuperação de óleo e maior perda de solvente no refinado. A mistura clorofórmio: metanol (2:1 v/v) é capaz de extrair a maior quantidade de óleo, entretanto, o clorofórmio por ser um solvente clorado tóxico e não sendo indicado em processos biotecnológicos com caráter sustentável. Logo, seria necessário um tratamento dos 75,85 kg de água que ficaram na fase refinado contendo, além de clorofórmio, metanol (BALASUBRAMANIAN; YEN DOAN; OBBARD, 2013). Dessa forma, o acetato de etila seria o mais indicado pela reduzida perda de massa, de menor impacto ambiental e de menor custo quando comparado as misturas.

3.6 Balanço de energia

As propriedades físicas dos solventes estudados e da água estão apresentadas na Tabela 4.8. Já os resultados de carga de solvente específica, energia intensiva sem recuperação (do acetato de etila, do etanol e do metanol) e energia intensiva com recuperação para os três sistemas de extração de óleo a partir da biomassa úmida rompida são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.8: Propriedades físicas (BERTULANI, 1999)

Propriedade	Acetato de etila	Clorofórmio	Metanol	Hexano	Etanol	Água
Densidade (kg/m ³)	902	1490	792	655	789	997
Calor específico (J/kg K)	1904	980	2550	2259	2397,43	4180
Ponto de ebulição (°C)	77,0	61,2	64,5	68,7	78,4	100,0
Entalpia vaporização (kJ/kg)	365,7	246,84	1099,56	334,72	836,80	2259,36

Fonte: A autora.

Tabela 4.9: Resultados balanço de massa e energia.

	Acetato de etila	Clorofórmio	Metanol	Hexano	Etanol
CSI (kg solvente/ kg óleo)	0,81	0,15	11,24	0,27	18,78
EI sem recuperação (MJ/kg)	12,75	3,74		10,19	
EI com recuperação (MJ/kg)	37,94	38,45 (3,74+34,71)		67,42 (10,19+57,23)	

Fonte: A autora.

Na Tabela 4.10, são apresentados os custos para recuperar e não recuperar os solventes acetato de etila, etanol e metanol e os custos para comprar a quantidade de solvente necessária para a extração do lipídio nos dois estágios. O custo do MJ industrial é R\$0,195 / MJ (DME-PC, 2020). O custo do acetato de etila é R\$ 12,50/ L, o do metanol é R\$ 4,95/ L, o do hexano é R\$ 6,30/ L. Tais preços foram disponibilizados pela empresa Atlanta Química em abril de 2021. Para os cálculos, considerou-se o preço do etanol de R\$ 5,70/ L e o do clorofórmio de R\$ 8,20/ L.

Tabela 4.10: Custos referentes à compra de solventes e energia gasta para recuperar e não recuperar o acetato de etila, metanol e etanol.

	Acetato de etila	Clorofórmio	Metanol	Hexano	Etanol
Custo para repor solventes (R\$/kg óleo)	11,18	0,84	70,31	2,28	135,67
Custo EI sem recuperação (R\$/ kg)	2,48		0,73		1,99
Custo total sem recuperação (Rep. Solvente + Energia, R\$/ kg)	13,66		71,88		139,94
Custo EI com recuperação (R\$/ kg)	7,39		6,77		11,16

Fonte: A autora.

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 4.8, verificamos que o tratamento da fase refinado, rica em água que arrasta majoritariamente etanol e metanol, confere maior parte do consumo de energia. O fato de o acetato de etila ser pouco solúvel e de baixa toxidez, não justifica sua recuperação, pois confere maior custo operacional ao processo (R\$ 2,48 para R\$ 7,39 por kg de óleo extraído). Por outro lado, as misturas requerem recuperação seja para descontaminação do efluente (metanol) ou por redução do custo com solventes (etanol), conferindo maior consumo de energia e custo ao se comparar a utilização do acetato de etila sem recuperação na corrente refinado.

O custo unitário associado ao solvente para a extração em dois estágios com acetato de etila (R\$ 2,48/kg de óleo, Tabela 4.10) ainda é elevado quando se vislumbra a produção de

óleo para produtos de baixo valor agregado, como biocombustíveis. Assim, pesquisas devem ser direcionadas para aumentar a concentração de óleo dispersa na fase aquosa, seja para indução do teor de lipídios nas células de microalgas, seja pela utilização de maior teor de biomassa dispersa; e simultânea redução da carga de solventes nos estágios de extração.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, verifica-se que o acetato de etila é capaz de extrair lipídios sem a necessidade de utilização de outro solvente como o hexano. Como o teste de carga não resultou em diferenças expressivas nos rendimentos procedeu-se os estudos empregando a carga de solvente: suspensão aquosa contendo 1% de óleo disperso de 1:10 (v/v). Com a comparação entre os solventes verificou-se que clorofórmio: metanol (1:2 v/v) é mais eficiente quando se observa que com apenas uma extração, já se extrai todo o óleo, enquanto que o acetato de etila e o hexano: etanol (1:1 v/v) precisam de duas extrações, levando a rendimentos finais iguais estatisticamente, considerando tanto o óleo modelo quanto o óleo modelo, quanto para o óleo da microalga.

Entretanto, para extração de óleo por meio da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* úmida e rompida, analisando-se as energias necessárias para a recuperação dos solventes, da quantidade de solvente a ser empregada e a ser perdida, da viabilidade econômica e da necessidade do tratamento de água a ser realizado visando à remoção do clorofórmio, têm-se se que o acetato de etila seria o mais recomendado.

Vê-se, portanto, que é possível a extração de óleo empregando apenas acetato de etila como solvente. Para tal, fez-se necessário rompimento da biomassa com maceração (rompimento mecânico), com tempo de extração de 1 h e temperatura a 25 °C. A carga de solvente: suspensão aquosa foi de 1:10 (v/v) e continha 1% de óleo disperso. Com essas condições, viu-se que é possível extrair o óleo empregando necessitando do menor custo, que foi de R\$ 13,66 (custo de reposição de acetato de etila + custo de energia sem recuperação de acetato de etila).

REFERÊNCIAS

- ADHAMI, L. et al. Liquid–Liquid Extraction of Butanol from Dilute Aqueous Solutions Using Soybean-Derived Biodiesel. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 86, n. 11, p.1123-1128, 7 ago. 2009.
- AFIFY, A. E. M. M. R. et al. Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 399–408, 2018.
- AGÊNCIA BRASIL. **Entenda como é produzido o biodiesel**. 2019. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/entenda-como-e-produzido-o-biodiesel-11-11-04>>. Acesso em: 10 jun. 2019.
- AGÊNCIA BRASIL. **Petrobras estuda produzir biodiesel a partir de microalgas**. 2019. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/algas/petrobras-estuda-produzir-biodiesel-partir-microalgas-070218>>. Acesso em: 22 abr. 2019.
- AHMAD, F. et al. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using Scenedesmus obliquus microalgae. **Journal of Environmental Management**, v. 240, n. March, p. 293–302, 2019.
- AJALA, S. O.; ALEXANDER, M. L. Assessment of Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus, and Oocystis minuta for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 2020.
- ALAM, M. A. et al. Enhanced isolation of lipids from microalgal biomass with high water content for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 291, n. May, p. 121834, 2019.
- ALVAREZ-GUERRA, E. et al. Modeling of the binodal curve of ionic liquid / salt aqueous systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 426, p. 10–16, 2016.
- AN, M. et al. Effects of nitrogen forms and supply mode on lipid production of microalga scenedesmus obliquus. **Energies**, v. 13, n. 3, p. 1–13, 2020.
- ANP. **Biodiesel**. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 06 maio 2019.
- APANDI, N. M. et al. Protein and Lipid Content of Microalgae Scenedesmus sp. Biomass Grown in Wet Market Wastewater. **MATEC Web of Conferences**, v. 103, 2017.
- BAIRD, R.B.; EATON, A. D. (org.). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 23aed. Washington DC: American P. In: RICE, Eugene W.; BAIRD, R.B.;

- EATON, Andrew D. (org.). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 23^aed. Washington DC: American Public Health Association, 2017. p. 55–59.
- BARCELLOS, A. D. et al. Microalgas e seu potencial de uso. *Cadernos de Prospecção*, Salvador, v. 5, n. 4, p.178-184, 2012.
- BARCELOS, Tamires Teixeira et al. Liquid-Liquid Extraction of Neutral Lipids and Free Fatty Acids from Microalgae Oil. **Journal of Chemical and Engineering Data**, [s. l.], v. 63, n. 9, p. 3391–3399, 2018.
- BALASUBRAMANIAN, R. K.; YEN DOAN, T. T.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 215–216, p. 929–936, 2013.
- BATISTA, A. P. et al. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Fuel**, v. 117, n. PART A, p. 537–543, 2014.
- BAXTER, Terry E.; REXING, David J. Physical and aggregate properties: Solids. In: RICE, Eugene W.; BAIRD, R.B.; EATON, Andrew D. (org.). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 23^aed. Washington DC: American Public Health Association, 2017. p. 55–59.
- BERTULANI, Carlos. Propriedade de fluidos. **IF-UFRJ**, 1999. Disponível em: <https://www.if.ufrj.br/~bertu/fis2/hidrostatica/tabela_LIQ.html>. Acesso em: 21, abr. e 2021.
- BLIGH, E.G. AND DYER, W.J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 37, n. 8, 1959.
- BUCHGRABER, Manuela *et al.* Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 106, n. 9, p. 621–648, 2004.
- CHANG, C. H. et al. In situ catalyst-free biodiesel production from partially wet microalgae treated with mixed methanol and castor oil containing pressurized CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 157, p. 104702, 2020.
- CARDOSO, A. da S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p.542-549, 2011.

- CHENGZONG Z. Production method of microalgae biodiesel. CN n° CN108690665 (A), 29 jun. 2018, 23 out. 2018.
- CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.
- COM 6,4 bilhões de litros de biodiesel, setor vai concluir 2020 com produção recorde. **TnPetróleo**, Rio de Janeiro. 05 nov. 2020. Disponível em: <https://tnpetroleo.com.br/noticia/com-64-bilhoes-de-litros-de-biodiesel-setor-vai-concluir-2020-com-producao-recorde/>. Acesso em: 19 mar. 2021.
- DA ROSA, A. C. S. et al. Obtaining oil from macauba kernels by ultrasound-assisted extraction using ethyl acetate as the solvent. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 22, p. 1–10, 2019.
- DAGOSTIN, J. L. A. et al. Liquid-liquid equilibrium and kinetics of ethanolic extraction of soybean oil using ethyl acetate as co-solvent. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 415–427, 2018.
- DE JESUS, S. S.; FILHO, R. M. Recent advances in lipid extraction using green solvents. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 133, n. September 2019, 2020.
- DE VASCONCELLOS, A. *et al.* Biocatalysts based on nanozeolite-enzyme complexes: Effects of alkoxysilane surface functionalization and biofuel production using microalgae lipids feedstock. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 165, p. 150–157, 2018.
- DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163–1174, 2007.
- DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, dez. 2006.
- ECODEBATE. Brasil investe na pesquisa de biodiesel a partir do óleo de microalgas. 2015. Disponível em: <<https://www.ecodebate.com.br/2015/01/06/brasil-investe-na-pesquisa-de-biodiesel-a-partir-do-oleo-de-microalgas/>>. Acesso em: 06 maio 2019.
- EL-CHAGHABY, G. A. et al. Assessment of phytochemical components, proximate composition and antioxidant properties of *scenedesmus obliquus*, *chlorella vulgaris* and *spirulina platensis* algae extracts. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 23, n. 4, p. 521–526, 2019.

- EL-SHEEKH, M.M. et al. Outdoor cultivation of the green microalga *Chlorella vulgaris* under stress conditions as a feedstock for biofuel. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 18520–18532, 2019.
- ELLISON, C. R.; OVERA, S.; BOLDOR, D. Central composite design parameterization of microalgae/cyanobacteria co-culture pretreatment for enhanced lipid extraction using an external clamp-on ultrasonic transducer. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, n. May, p. 496–503, 2019.
- FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, p.437-448, 2013.
- FRANK, T. C. et al. Liquid-Liquid Extraction and Other Liquid-Liquid Operations and Equipment. In: PERRY, Robert H; GREEN, Don W (Ed.). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. 8. ed. New York: MacGraw-Hill, 2008. Cap. 15. p. 1681-1785.
- FERREIRA, M. C. et al. Liquid-liquid equilibrium of systems containing triacylglycerols (canola and corn oils), diacylglycerols, monoacylglycerols, fatty acids, ester and ethanol at T/K=303.15 and 318.15. **Fluid Phase Equilibria**, [s. l.], v. 404, p. 32–41, 2015.
- GAN, X. et al. Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. *Desalination*, v. 400, p. 1–6, 2016.
- GHASEMI NAGHDI, Forough *et al.* Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 718–726, 2016.
- GARCIA, C. M. et al. Transesterification of soybean oil catalyzed by sulfated zirconia. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6608–6613, 2008.
- GEANKOPLIS, C. J. *Transport Processes and Unit Operations*. Prentice-Hall International, 3ª edição, Minnesota, 921p, 1993.
- GOMES, M G; DE MORAIS, L C; PASQUINI, D. Use of membranas for biogas purification: review. **Holos Environment**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.466-501, 30 jul. 2019. *Lepidus Tecnologia*.
- GONÇALVES, C. B. et al. Deacidification of palm oil by solvent extraction. **Separation And Purification Technology**, v. 160, p.106-111, 2016.
- GONÇALVES, D. et al. Liquid-liquid equilibrium of rosemary model essential oil (α -pinene + eucalyptol + camphor) and solvent (ethanol + water) at room conditions. *Fluid Phase Equilibria*, [s. l.], v. 521, p. 112730, 2020.

- GONG, Yangyang et al. Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, [s. l.], v. 501, n. 25, p. 455–464, 2018.
- GORGICH, M. et al. Comparison of different lipid extraction procedures applied to three microalgal species. **Energy Reports**, [s. l.], v. 6, p. 477–482, 2020.
- GUIHÉNEUF, F.; SCHMID, M.; STENGEL, D. B. Lipids and Fatty Acids in Algae: Extraction, Fractionation into Lipid Classes, and Analysis by Gas Chromatography Coupled with Flame Ionization Detector (GC-FID). In: STENGEL, Dagmar B.; CONNAN, Solène (org.). *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols*. [S. l.]: Humana Press, 2015. v. 1308, p. 173–190.
- GUPTA, S. K. et al. Cultivation of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* in wastewater: Fuzzy intelligence for evaluation of growth parameters and metabolites extraction. **Journal of Cleaner Production**, v. 147, p. 419–430, 2017.
- HAAS, M. J.; WAGNER, K. Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 10, p. 1219–1229, 2011.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.
- HAN, J. et al. (Liquid + liquid) equilibrium of (imidazolium ionic liquids + organic salts) aqueous two-phase systems at $T = 298.15$ K and the influence of salts and ionic liquids on the phase separation. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 45, n. 1, p. 59–67, 2012.
- HUANG, Xin et al. Liquid-liquid equilibrium of binary and ternary systems composed by palm oil or palm oil fractions with methanol/ethanol and water. *Fluid Phase Equilibria*, [s. l.], v. 404, p. 17–25, 2015.
- IDO, A. L. et al. Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction. **Energy**, v. 157, p. 949–956, 2018.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 5B: 1986: cheese and processed cheese products: determination of fat content (gravimetric method) (reference method). 7p. Brussels, 1986.

- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1a Edição Digital. Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos, [s. l.], 2008.
- JEEVAN KUMAR, S. P. et al. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. **Algal Research**, [s. l.], v. 21, p. 138–147, 2017.
- KALSUM, U. et al. Lipid extraction from spirulina platensis using microwave for biodiesel production. **Korean Chemical Engineering Research**, v. 57, n. 2, p. 301–304, 2019.
- KANDA, H. et al. Lipid extraction from microalgae covered with biomineralized cell walls using liquefied dimethyl ether. **Fuel**, v. 262, n. November 2019, p. 116590, 2020.
- KRISHNAN, Sooridarsan et al. Microwave-assisted lipid extraction from *Chlorella vulgaris* in water with 0.5%–2.5% of imidazolium based ionic liquid as additive. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 149, p. 244–252, 2020.
- KWAK, M. et al. Solvent screening and process optimization for high shear-assisted lipid extraction from wet cake of *Nannochloropsis* sp. **Renewable Energy**, v. 149, p. 1395–1405, 2019.
- LAM, Man Kee; LEE, Keat Teong; MOHAMED, Abdul Rahman. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 500–518, 2010.
- LI, Pei Lei et al. Evaluation of lipid extraction from microalgae based on different phase regions of CO₂-expanded ethanol. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, [s. l.], v. 138, n. February, p. 1–6, 2019.
- LOHANI, U. C.; FALLAHI, P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Comparison of ethyl acetate with hexane for oil extraction from various oilseeds. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, [s. l.], v. 92, n. 5, p. 743–754, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2644-1>
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Analytical Biochemistry**. 193: 265–275, 1951.
- LU, W. et al. Optimization of algal lipid extraction by mixture of ethyl acetate and ethanol via response surface methodology for biodiesel production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 2575–2581, 2016.
- LU, W.; WANG, Z.; YUAN, Z. Characteristics of lipid extraction from *Chlorella* sp. cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 191, p. 433–437, 2015.

- LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: Interfering substances. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 2, p. 149–154, 1999.
- M, V. P. et al. Kinetic and thermodynamic studies on the extraction of bio oil from *Chlorella vulgaris* and the subsequent biodiesel production. **Chemical Engineering Communications**, v. 206, n. 3, p. 409–418, 2019.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel Production: A Review. **Bioresource Technology**, v.70, p.1–15, 1999.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. *et al.* Biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification. **Fuel**, [s. l.], v. 150, p. 14–20, 2015.
- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p.69-72, abr. 2005.
- MATHIMANI, T. et al. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. *Journal of Cleaner Production*, 2018.
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.285-293, 1998.
- MOLINA GRIMA, E.; GONZÁLEZ, M. J. I.; GIMÉNEZ, A. G. Solvent Extraction Microalgae Lipids. *Algae for Biofuels*, c.11, p.187-205, 2013.
- MORAES, L. DE S. et al. Liquid-liquid extraction of succinic acid using a hollow fiber membrane contactor. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 206–211, 2015.
- MORENO-GARCIA, L. et al. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p.493-506, set. 2017.
- MORIYOSHI, T. et al. (Liquid + liquid) equilibria of (water + ethanol + n-hexane) from 0.1 to 200 MPa at 298.15 K. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 551–557, 1988.
- MUÑOZ, Robinson *et al.* Preliminary biorefinery process proposal for protein and biofuels recovery from microalgae. **Fuel**, [s. l.], v. 150, p. 425–433, 2015.
- NASSEF, A. M. et al. Application of fuzzy modelling and Particle Swarm Optimization to enhance lipid extraction from microalgae. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, [s. l.], v. 35, n. May, p. 73–79, 2019.

- ONUMAEGBU, C. et al. Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 132, p. 1323–1331, 2019.
- PARK, Jeongseok et al. Wet in situ transesterification of microalgae using ethyl acetate as a co-solvent and reactant. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 230, p. 8–14, 2017.
- PATEL, A. et al. Extraction of lipids from algae using supercritical carbon dioxide. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2020.
- PELEGI, Alexandre. Mistura de biodiesel ao diesel fóssil já é de 13% desde essa segunda-feira (1º). **Diário do transporte**, 02 mar. 2021. Disponível em: <https://diariodotransporte.com.br/2021/03/02/mistura-de-biodiesel-ao-diesel-fossil-ja-e-de-13-desde-essa-segunda-feira-01/>. Acesso em: 19 mar. 2021.
- PENG, Weimin; WU, Qingyu; TU, Pingguan. Effects of temperature and holding time on production of renewable fuels from pyrolysis of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 147–152, 2000.
- PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p.2013-2018, 2012.
- PINTO, L.F.R. et al. **Estudo da extração de lipídios em três cepas de microalga**. In: 10º Congresso Internacional de Bioenergia, 2015, São Paulo. 10º Congresso Internacional de Bioenergia, 2015.
- PRÉAT, N. et al. Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets. *Algal Research*, [s. l.], v. 45, n. November 2019, p. 101737, 2020.
- ROBLES-MEDINA, A et al., E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v.27, p.398-408, 2009.
- ROCHA, D. N. et al. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus spp.* **Bioresource Technology**, v. 289, n. April, p. 121644, 2019.
- ROCHA, D. N. et al. Improving biofuel production by thermochemical conversion of defatted *Scenedesmus obliquus* biomass. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 275, 2020.
- ROCHA, R. P. et al. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (*Chlorophyta*) isolated from tropical freshwater reservoirs. **Algal Research**, v. 28, n. October, p. 139–150, 2017.

- RODRIGUES, C. E. C. et al., Deacidification of rice bran oil by liquid–liquid extraction using a renewable solvent. **Separation And Purification Technology**, v. 132, p.84-92, 2014.
- ROUX, J. M.; LAMOTTE, H.; ACHARD, J. L. An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework. **Energy Procedia**, v. 112, n. October 2016, p. 680–688, 2017.
- RYCKEBOSCH, Eline *et al.* Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species. **Algal Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 36–43, 2014.
- SAJJADI, Baharak *et al.* Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 97, n. July, p. 200–232, 2018.
- SAN PEDRO, A. et al. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.134, p.353-361, 2013.
- SATI, H. et al. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production : A review. **Algal Research**, [s. l.], v. 38, n. July 2018, p. 101413, 2019.
- SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. Separation Process Principles, John Wiley & Sons, 3ª edição, Salt Lake City, 821p, 2006.
- SHANKAR, M. et al. Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water *Chlorella* and *Chlorococcum* microalgae. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, n. January, p. 228–236, 2017.
- SHARMA, K. K.; SCHUHMAN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v.5, p.1532–1553, 2012.
- SHIN, Hee Yong et al. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. *Fuel*, [s. l.], v. 130, n. April, p. 66–69, 2014.
- SHIOZAWA, S. et al. Liquid-liquid equilibrium data and thermodynamic modeling of systems involved in the biodiesel production in terms of acylglycerols, free fatty acids, ethyl esters, and ethanol at 303.2 and 318.2 K and local pressure. **Fluid Phase Equilibria**, [s. l.], v. 507, p. 112431, 2020.
- SILVA, R. M. D; BACHOLSKY, R. G.; JERÔNIMO, C. E. de M. Produção de Biodiesel por Algas: Integração com Processos de Carcinicultura. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, Santa Maria, v. 19, n. 3, p.713-724, 2015.

- SILVE, A. et al. Extraction of lipids from wet microalga *Auxenochlorella protothecoides* using pulsed electric field treatment and ethanol-hexane blends. **Algal Research**, v. 29, n. June 2017, p. 212–222, 2018.
- SIRAKOV, I. et al. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. **International Journal Of Fisheries And Aquatic Studies**. Bulgaria, p. 81-84. 2015.
- SKRZECZ, A. et al. IUPAC-NIST Solubility Data Series 69. Ternary Alcohol–Hydrocarbon–Water Systems. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 28, n. 4, p. 983–1235, 1999.
- SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M. Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- SUAREZ, Paulo A. Z. *et al.* Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 768–775, 2009.
- SYAO, Linxing et al. Microalgae lipid characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 1773–1787, 2015.
- TANG, W.; HO ROW, K.. Evaluation of CO₂-induced azole-based switchable ionic liquid with hydrophobic/hydrophilic reversible transition as single solvent system for coupling lipid extraction and separation from wet microalgae. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 296, n. October 2019, p. 122309, 2020.
- TARIFAS e taxas. **DME Poços de Caldas**, 2020. Disponível em: <<http://www.dme-pc.com.br/atendimento/tarifas>> Acesso em: 21 de abr. de 2021.
- TECHNICAL COMMITTEE ISO/TC 34, Food products; SUBCOMMITTEE SC 5, Milk and milk products; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, IDF. International Standard ISO 1735 | IDF 5: cheese and processed cheese products: determination of fat content (gravimetric method) (reference method). [S. l.: s. n.], 2004.
- TRIVEDI, J.; ATRAY, N.; AGRAWAL, .i. Evaluating Cell Disruption Strategies for Aqueous Lipid Extraction from Oleaginous *Scenedesmus obliquus* at High Solid Loadings. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 122, n. 4, p. 1–6, 2020.
- WILLIAMS, P. J. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v.3, p.554-590, 2010.

- WU, Jingcheng et al. Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 71, p. 323–329, 2017.
- YAO, L. et al. Microalgae lipid characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 1773–1787, 2015.
- YIN, Z. et al. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 301, n. January, p. 122804, 2020a.

APÊNDICE A – Cromatogramas

Figura 1: Cromatograma do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*.

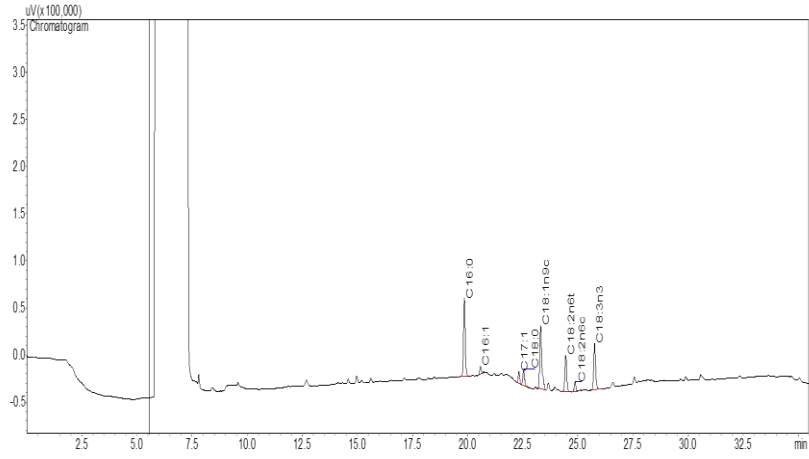


Figura 2: Cromatograma do óleo de coco comercial da marca Natural Life.

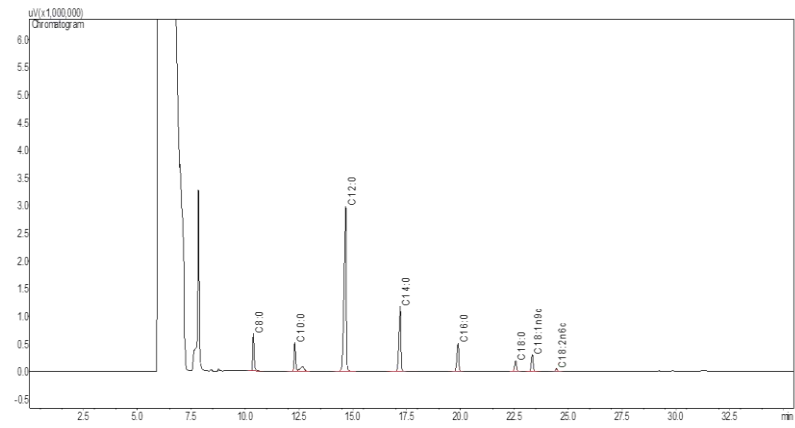


Figura 3: Cromatograma do óleo de chia comercial da marca Giroil.

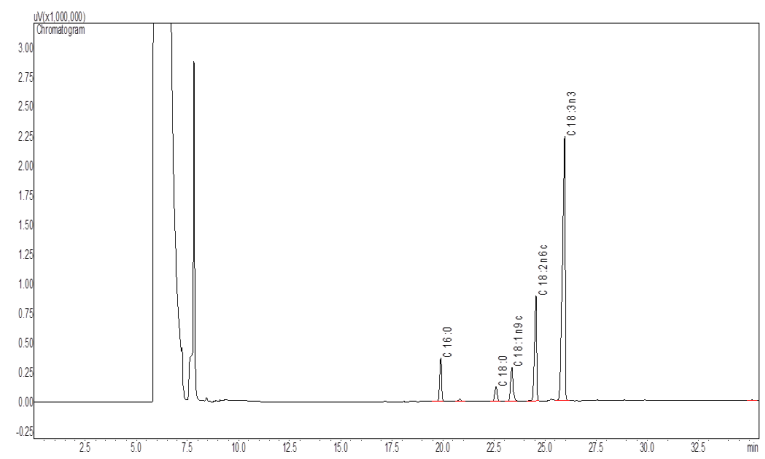


Figura 4: Cromatograma do óleo de dendê da marca Cepera.

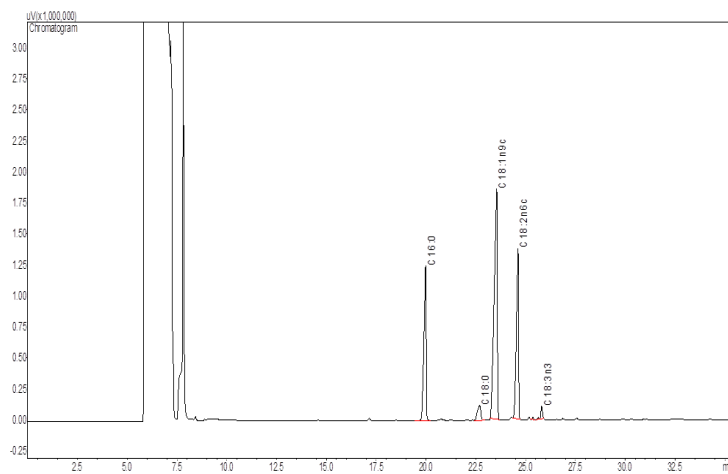


Figura 5: Cromatograma do óleo sintético da microalga *Scenedesmus obliquus* com acidez de 1-3%.

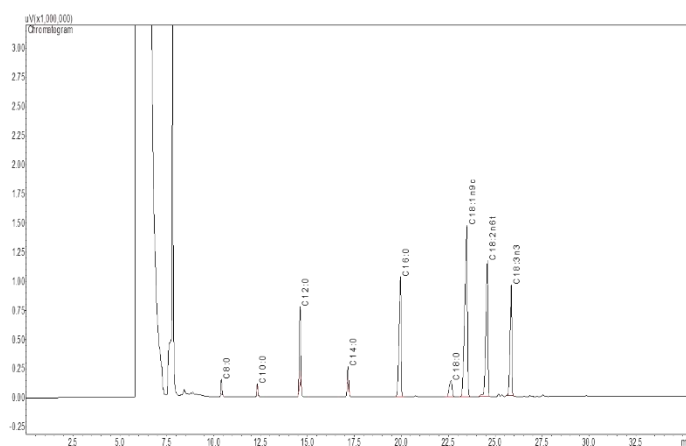


Figura 6: Cromatograma dos ácidos graxos livres (AGL) produzidos.

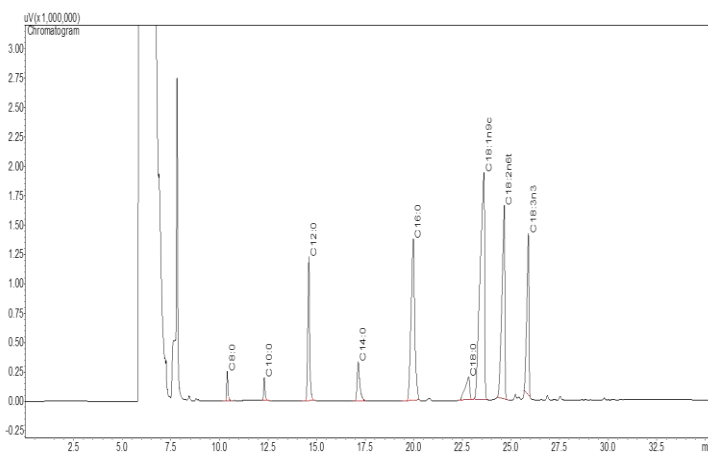


Figura 7: Cromatograma do óleo sintético da microalga *Scenedesmus obliquus* com acidez de 20%.

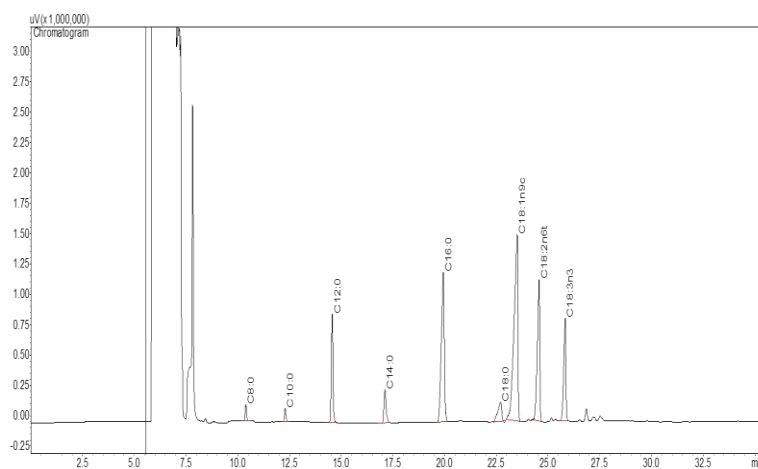
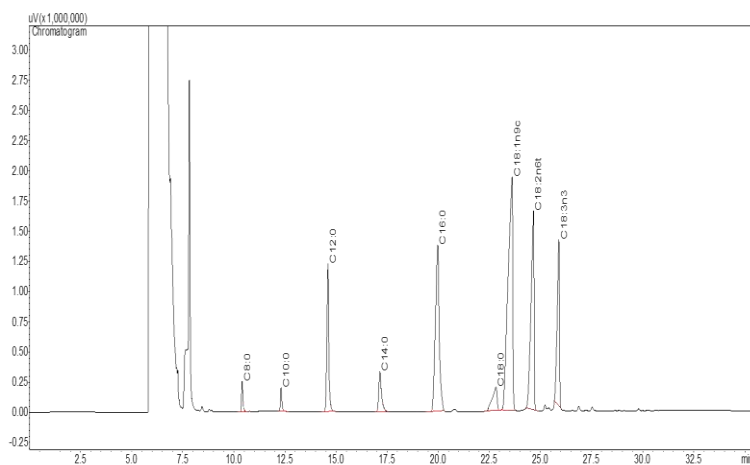


Figura 8: Cromatograma do óleo sintético da microalga *Scenedesmus obliquus* com acidez de 40%.



APÊNDICE B – Dados mapeamento diagrama de equilíbrio

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados os dados experimentais estudados para o mapeamento do diagrama de equilíbrio.

Tabela 1: Dados experimentais (pontos internos) para o sistema Óleo Modelo (2 %, 20 % e 40 % AGL) (1), Acetato de etila e Água (3) a 25, 35 e 45 ° C.

Pontos internos	Acetato de etila (mL)	Óleo Modelo (mL)	Água (mL)	Bifásico/ Monofásico
1	0,100	0,100	0,800	Bifásico
2	0,200	0,100	0,700	Bifásico
3	0,300	0,100	0,600	Bifásico
4	0,400	0,100	0,500	Bifásico
5	0,500	0,100	0,400	Bifásico
6	0,600	0,100	0,300	Bifásico
7	0,700	0,100	0,200	Bifásico
8	0,800	0,100	0,100	Bifásico
9	0,100	0,200	0,700	Bifásico
10	0,200	0,200	0,600	Bifásico
11	0,300	0,200	0,500	Bifásico
12	0,400	0,200	0,400	Bifásico
13	0,500	0,200	0,300	Bifásico
14	0,600	0,200	0,200	Bifásico
15	0,700	0,200	0,100	Bifásico
16	0,100	0,300	0,600	Bifásico
17	0,200	0,300	0,500	Bifásico
18	0,300	0,300	0,400	Bifásico
19	0,400	0,300	0,300	Bifásico
20	0,500	0,300	0,200	Bifásico
21	0,600	0,300	0,100	Bifásico
22	0,100	0,400	0,500	Bifásico
23	0,200	0,400	0,400	Bifásico
24	0,300	0,400	0,300	Bifásico
25	0,400	0,400	0,200	Bifásico
26	0,500	0,400	0,100	Bifásico
27	0,100	0,500	0,400	Bifásico
28	0,200	0,500	0,300	Bifásico
29	0,300	0,500	0,200	Bifásico
30	0,400	0,500	0,100	Bifásico
31	0,100	0,600	0,300	Bifásico
32	0,200	0,600	0,200	Bifásico
33	0,300	0,600	0,100	Bifásico
34	0,100	0,700	0,200	Bifásico

35	0,200	0,700	0,100	Bifásico
36	0,100	0,800	0,100	Bifásico

Tabela 2: Dados experimentais (pontos axiais) para o sistema Óleo Modelo (2 %, 20 % e 40 % AGL) (1), Acetato de etila e Água (3) a 25, 35 e 45 ° C.

Pontos Axiais	Acetato de etila (mL)	Óleo Modelo (mL)	Água (mL)	Bifásico/ Monofásico
37	0,100	0,000	0,900	Bifásico
38	0,300	0,000	0,700	Bifásico
39	0,500	0,000	0,500	Bifásico
40	0,700	0,000	0,300	Bifásico
41	0,900	0,000	0,100	Bifásico
42	0,100	0,900	0,000	Monofásico
43	0,300	0,700	0,000	Monofásico
44	0,500	0,500	0,000	Monofásico
45	0,700	0,300	0,000	Monofásico
46	0,900	0,100	0,000	Monofásico
47	0,000	0,100	0,900	Monofásico
48	0,000	0,300	0,700	Bifásico
49	0,000	0,500	0,500	Bifásico
50	0,000	0,700	0,300	Bifásico
51	0,000	0,900	0,100	Bifásico
52	0,050	0,000	0,950	Monofásico

Tabela 3: Dados experimentais (pontos internos) para o sistema Óleo Modelo (2 %, 20 % e 40 % AGL) (1), Acetato de etila e Água (3) a 25, 35 e 45 ° C.

Pontos internos	Acetato de etila (mL)	Óleo Modelo (mL)	Água (mL)	Bifásico/ Monofásico
53	0,098	0,882	0,020	Bifásico
54	0,294	0,686	0,020	Bifásico
55	0,490	0,490	0,020	Bifásico
56	0,686	0,294	0,020	Monofásico
57	0,882	0,098	0,020	Monofásico
53	0,000	0,714	0,286	Bifásico
54	0,000	0,882	0,118	Bifásico
55	0,000	0,926	0,074	Bifásico
56	0,000	0,946	0,054	Bifásico
57	0,000	0,957	0,043	Bifásico

APÊNDICE C– Dados das curvas binodais

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados os dados obtidos pelo método da titulação turbidimétrica, os quais foram utilizados para construção das curvas binodais. Em que, w_1 é a fração mássica de óleo modelo e w_2 é a fração mássica de acetato de etila.

Tabela 1: Dados da curva binodal para o sistema Óleo Modelo (2 %, 20 % e 40 % AGL) (1), Acetato de etila e Água (3) a 25° C.

2 % AGL		20 % AGL		40 % AGL	
Acetato de etila	Óleo Modelo	Acetato de etila	Óleo Modelo	Acetato de etila	Óleo Modelo
0,000	0,985	0,004	0,961	0,000	0,939
0,035	0,947	0,025	0,944	0,022	0,934
0,080	0,897	0,060	0,907	0,049	0,917
0,109	0,869	0,100	0,878	0,100	0,878
0,143	0,841	0,134	0,848	0,126	0,856
0,184	0,805	0,165	0,817	0,156	0,827
0,224	0,763	0,205	0,777	0,179	0,802
0,269	0,721	0,237	0,748	0,207	0,775
0,296	0,694	0,280	0,711	0,230	0,751
0,342	0,649	0,311	0,676	0,240	0,739
0,379	0,615	0,336	0,657	0,263	0,710
0,404	0,587	0,369	0,622	0,263	0,710
0,439	0,551	0,394	0,597	0,297	0,681
0,482	0,506	0,422	0,559	0,320	0,656
0,534	0,447	0,461	0,514	0,357	0,619
0,583	0,397	0,485	0,482	0,374	0,599
0,611	0,362	0,508	0,453	0,414	0,556
0,652	0,314	0,547	0,407	0,437	0,531
0,689	0,265	0,587	0,367	0,458	0,507
0,710	0,240	0,618	0,326	0,472	0,492
0,745	0,199	0,643	0,294	0,510	0,453
0,785	0,152	0,672	0,260	0,538	0,423
0,824	0,106	0,696	0,230	0,570	0,384
		0,717	0,201	0,617	0,333
				0,617	0,333
				0,642	0,299
				0,664	0,267
				0,680	0,250
				0,697	0,223
				0,712	0,201
				0,736	0,167

0,749 0,145

Tabela 2: Dados da curva binodal para o sistema Óleo Modelo (2 %, 20 % e 40 % AGL) (1), Acetato de etila e Água (3) a 35° C.

2 % AGL		20 % AGL		40 % AGL	
Acetato de etila	Óleo Modelo	Acetato de etila	Óleo Modelo	Acetato de etila	Óleo Modelo
0,000	0,968	0,000	0,983	0,000	0,987
0,017	0,951	0,030	0,944	0,021	0,966
0,047	0,922	0,056	0,917	0,047	0,939
0,075	0,895	0,082	0,890	0,069	0,912
0,133	0,834	0,109	0,866	0,096	0,888
0,154	0,815	0,138	0,841	0,115	0,866
0,177	0,785	0,168	0,815	0,127	0,851
0,195	0,766	0,195	0,788	0,151	0,824
0,225	0,732	0,222	0,763	0,169	0,805
0,246	0,707	0,262	0,729	0,187	0,785
0,317	0,641	0,305	0,683	0,207	0,763
0,343	0,619	0,326	0,664	0,228	0,741
0,378	0,582	0,351	0,636	0,259	0,714
0,412	0,548	0,376	0,615	0,277	0,699
0,447	0,511	0,413	0,569	0,297	0,680
0,472	0,483	0,464	0,503	0,310	0,668
0,511	0,448	0,500	0,454	0,329	0,646
0,547	0,409	0,542	0,410	0,355	0,624
0,579	0,370	0,575	0,368	0,373	0,604
0,612	0,338	0,597	0,338	0,388	0,590
0,642	0,304	0,633	0,304	0,404	0,578
0,668	0,277	0,651	0,277	0,423	0,557
0,708	0,235	0,681	0,238	0,446	0,531
0,737	0,199	0,717	0,174	0,465	0,512
0,760	0,164	0,743	0,140	0,493	0,487
0,779	0,140	0,760	0,106	0,504	0,475
				0,516	0,459
				0,533	0,438
				0,561	0,411
				0,577	0,389
				0,597	0,360
				0,625	0,332
				0,642	0,307
				0,662	0,282
				0,679	0,257

0,704	0,218
0,735	0,181
0,750	0,159

Tabela 3: Dados da curva binodal para o sistema Óleo Modelo (2 %, 20 % e 40 % AGL) (1), Acetato de etila e Água (3) a 45° C.

2 % AGL		20 % AGL		40 % AGL	
Acetato de etila	Óleo Modelo	Acetato de etila	Óleo Modelo	Acetato de etila	Óleo Modelo
0,000	0,985	0,000	0,984	0,000	0,986
0,023	0,956	0,023	0,962	0,023	0,955
0,049	0,934	0,059	0,925	0,056	0,923
0,078	0,910	0,091	0,896	0,092	0,884
0,106	0,881	0,138	0,848	0,121	0,859
0,135	0,856	0,168	0,813	0,154	0,820
0,160	0,827	0,209	0,764	0,181	0,786
0,192	0,793	0,243	0,729	0,211	0,762
0,236	0,751	0,286	0,683	0,238	0,727
0,282	0,707	0,315	0,654	0,271	0,695
0,342	0,649	0,357	0,612	0,304	0,654
0,386	0,599	0,394	0,573	0,334	0,625
0,420	0,565	0,428	0,536	0,378	0,578
0,482	0,506	0,454	0,514	0,413	0,539
0,534	0,447	0,481	0,482	0,437	0,507
0,577	0,390	0,508	0,453	0,470	0,471
0,601	0,355	0,537	0,421	0,506	0,436
0,620	0,323	0,562	0,387	0,537	0,399
0,649	0,277	0,591	0,355	0,565	0,364
0,678	0,235	0,616	0,326	0,598	0,323
0,710	0,179	0,646	0,292	0,629	0,287
0,736	0,138	0,671	0,262	0,648	0,267
		0,697	0,228	0,671	0,228
		0,712	0,199	0,689	0,201
		0,740	0,162	0,712	0,172
				0,729	0,142

APÊNDICE D– Análise de identidade

Na Tabela 1 é apresentado os valores de inclinação utilizados para a análise de identidade realizada para averiguar a influência da temperatura e % de AGL no comportamento da curva binodal.

Tabela 1: Inclinações.

w _{1p}	w _{2p} 25°C 2%AGL	w _{2p} 25°C 20%AGL	w _{2p} 25°C 40%AGL	w _{2p} 35°C 2%AGL	w _{2p} 35°C 20%AGL	w _{2p} 35°C 40%AGL	w _{2p} 45°C 2%AGL	w _{2p} 45°C 20%AGL	w _{2p} 45°C 40%AGL
25°C 2%AGL	1	1,0080	0,9191	0,8788	1,1269	1,0403	1,2114	0,8971	0,9066
25°C 20%AGL		1	0,9123	0,8715	1,1173	1,0311	1,2008	0,8898	0,8991
25°C 40%AGL			1	0,9545	1,2230	1,1284	1,3141	0,9744	0,9844
35°C 2%AGL				1	1,2822	1,1836	1,3782	1,0209	1,0317
35°C 20%AGL					1	0,9233	1,0751	0,7959	0,8044
35°C 40%AGL						1	1,1643	0,8617	0,8710
45°C 2%AGL							1	0,7402	0,7481
45°C 20%AGL								1	1,0105
45°C 40%AGL									1