UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GUILHERME ARANTES PEDRO

**Síntese de ésteres etílicos de ácido graxos por transesterificação direta de
biomassa de microalga marinha *Chlorella minutissima***

Lorena - SP
2017

GUILHERME ARANTES PEDRO

**Síntese de ésteres etílicos de ácido graxos por transesterificação direta de
biomassa de microalga marinha *Chlorella minutissima***

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química na área de concentração: Processos
Catalíticos e Biocatalíticos

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Setembro, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Arantes Pedro, Guilherme

Síntese de ésteres etílicos de ácido graxos por transesterificação direta de biomassa de microalga marinha *Chlorella minutissima* / Guilherme Arantes Pedro; orientador Messias Borges Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017.
134 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Messias Borges Silva

1. Transesterificação in situ. 2. Ésteres etílicos de ácido graxos. 3. Microalga. 4. *Chlorella minutissima*. 5. Método de taguchi. I. Título. II. Borges Silva, Messias , orient.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial, em memória de minha mãe Edna Arantes Pedro (1965-2013), que sempre me incentivaram em meus projetos de vida e por serem exemplo de amor e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder saúde, sabedoria, fé e perseverança para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Edna e Élcio, por toda paciência, amor, apoio e suporte durante todos esses anos desde a graduação.

Aos meus familiares e amigos, por todo incentivo e reconhecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Messias Borges Silva, pela confiança, exemplo de profissional, e por acreditar neste trabalho.

À todos os professores da Escola de Engenharia de Lorena pelas sugestões, contribuições e aprendizados durante o período do mestrado.

À todos os colegas de pós-graduação, de laboratório pelo convívio e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro

RESUMO

Pedro, G. A. **Síntese de ésteres etílicos de ácido graxos por transesterificação direta de biomassa de microalga marinha *Chlorella minutissima***. 2017. 134p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Atualmente, as microalgas têm se mostrado uma matéria prima de interesse para a produção de biocombustíveis, por ser uma fonte renovável, não poluente e por não competir em áreas de cultivos de alimentos. No entanto, há a necessidade de se explorar fatores e metodologias na produção de biodiesel de microalgas para que o processo seja viabilizado. Este estudo buscou potencializar o processo de transesterificação direta (extração e reação simultaneamente) da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* para a produção de ésteres etílicos brutos tendo em vista a produção de biodiesel. O processamento direto (*in situ*) investigou separadamente o uso da biomassa seca e úmida, sob os efeitos dos fatores etanol, clorofórmio e ácido como catalisador. A metodologia de Taguchi foi utilizada como planejamento de experimentos para potencializar a conversão e rendimento mássico em ésteres etílicos. A partir da biomassa seca, analisadas as razões de etanol/biomassa de 100, 50, 25 e 10 mL/g teve a maximização dos resultados utilizando 25 mL de etanol (86,16% em massa com 96% de conversão) e 50 mL de etanol (104% em massa com 88% de conversão), ambas, com 5 mL de clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico por grama de biomassa. Posteriormente, com a inclusão dos catalisadores ácidos HCl e H₂SO₄ como variável, investigou-se o a reação de transesterificação *in situ* a partir da biomassa úmida (84% em base seca). Ambos ácidos demonstraram não ter efeito sobre as repostas. A maximização tanto do rendimento mássico quanto da conversão (131,5% em massa com 84% de conversão), bem como produzir a maior quantidade de ésteres com a menor uso de reagentes, utiliza a concentração do ácido a 0,6 mol/L, 25 mL de etanol e proporção de 1:10 de clorofórmio. Tanto a partir da biomassa seca quanto a partir da biomassa úmida, a metodologia de Taguchi foi capaz de determinar os melhores ajustes das condições reacionais para a síntese de ésteres etílicos brutos sem a necessidade de aplicar condições reacionais limitadas pela construção ou segurança do projeto como irradiação de micro-ondas ou condições supercríticas.

Palavras-chave: Transesterificação *In situ*. Ésteres etílicos de ácido graxos. Microalga. *Chlorella minutissima*. Método de Taguchi.

ABSTRACT

Pedro, G. A. **Synthesis of fatty acid ethyl esters by direct transesterification of marine microalgae biomass *Chlorella minutissima***. 2017. 134p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Currently, microalgae are considered an interest feedstock for the biofuel production, since they correspond to a renewable and non-polluting source, not competing with food crops areas. However, there is a need to explore factors and methodologies in the production of microalgae biodiesel to enable the process. This study aimed to enhance the direct transesterification process (simultaneous extraction and reaction) of the *Chlorella minutissima* microalgae for the crude ethyl esters production in order to produce biodiesel. The direct processing (*in situ*) was investigated separately dry and wet biomass use under the effects of ethanol, chloroform and acid as a catalyst. The Taguchi methodology (design of experiments) was used to increase conversion and ethyl esters mass yields. The ethanol ratios 100, 50, 25 and 10 mL/g were analyzed from dry biomass. The results were maximized using 25 mL of ethanol (86.16% by mass with 96% conversion) and 50 mL (104% by mass with 88% conversion) with 5 mL of chloroform and 1 mL of sulfuric acid per gram of biomass. Subsequently, with the inclusion of acid catalysts HCl and H₂SO₄ as a variable, the *in situ* transesterification reaction of wet biomass (84% on dry basis) was investigated. In both cases, the acids showed no effect on the responses. Mass yield and conversion were maximized (131.5% by mass with 84% conversion), as the highest number of esters with the lowest use of reagents, take 0.6 mol/L acid concentration, 25 mL ethanol and 1:10 chloroform ratio. Taguchi methodology was able to determine the best reaction conditions adjustments for crude ethyl esters synthesis from dry biomass and wet biomass were met without the need to apply reaction conditions limited by the construction or project safety, as microwave irradiation or supercritical conditions.

Keywords: *In situ* transesterification. Fatty acid ethyl esters. Microalgae. *Chlorella minutissima*. Taguchi Method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma das etapas de trabalho e suas respectivas matrizes e variáveis de estudo.	21
Figura 2 Consumo de energia por combustível previsto até 2040.....	24
Figura 3 Produção mundial anual de óleo	25
Figura 4 Perfil Nacional de matérias-primas para produção de biodiesel em dezembro de 2015	25
Figura 5 Sensibilidade global do custo de produção de biodiesel de microalgas .	30
Figura 6 Reação de esterificação de ácido graxo.....	31
Figura 7 Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	32
Figura 8 Pesquisas e publicações de TEIS desde 1985 a 2015.....	33
Figura 9 Mecanismo do processo de Transesterificação In situ; (a) difusão dos reagentes através da parede celular; (b) difusão dos lipídios e ácidos graxos para o meio reacional; (c) difusão dos lipídios e ácidos graxos através da parede celular rompida.....	35
Figura 10 Diagrama esquemático do processo de biorefinaria de microalgas	50
Figura 11 Diagrama esquemático de biorefinaria de microalgas para a produção de biocombustíveis	52
Figura 12 Gráficos lineares de Taguchi para a matriz experimental L8 de Taguchi	54
Figura 13 Etapas do trabalho	56
Figura 14 Fotobiorreatores utilizados para cultivada biomassa	58
Figura 15 Fotobiorreatores de coluna (a) após inoculação do meio de cultivo e (b) no 8º dia de cultivo.....	59
Figura 16 Tanque de Floculação: (a) cultivo sem o sulfato de alumínio e (b) cultivo após 60 minutos da adição do sulfato de alumínio	60
Figura 17 Representação experimental para a reação de TEIS	61
Figura 18 Aparato real utilizado no processo de TEIS	61
Figura 19 Processo de separação dos produtos	62
Figura 20 Hidrogênios utilizados na quantificação da transesterificação dos lipídios (a) éster metílico e (b) éster etílico	65

Figura 21 Quantidade de óleo extraído via solventes utilizada como controle para cálculo do rendimento mássico do processo de TEIS.	65
Figura 22 Área do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio etoxílicos dos ésteres etílicos em espectro de RMN ¹ H.....	67
Figura 23 Representação ilustrativa do estudo exploratório para investigação da razão etanol/biomassa.....	70
Figura 24 Gráfico linear de Taguchi para a matriz experimental L8	74
Figura 25 Espectro de RMN ¹ H para (a) amostra de óleo extraído e (b) amostra após transesterificação	76
Figura 26 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 4 Matriz L4 A	79
Figura 27 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 3 Matriz L4 B	79
Figura 28 Gráficos de efeitos principais para as médias de %m/m para as razões etanol/biomassa 100mL/g e 50mL/g (Matriz L4 A)	82
Figura 29 Gráficos de efeitos principais para as médias de %m/m para as razões etanol/biomassa 25mL/g e 10mL/g (Matriz L4 B)	84
Figura 30 Gráficos de efeitos principais para as médias de % EE para as razões etanol/biomassa 100mL/g e 50mL/g (Matriz L4 A)	87
Figura 31 Espectro de RMN ¹ H - Experimento confirmatório Matriz L4 A	88
Figura 32 Gráficos de efeitos principais para as médias de % EE para as razões etanol/biomassa 25mL/g e 5mL/g (Matriz L4 B)	89
Figura 33 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida – a) experimento 4, b) experimento 8.....	92
Figura 34 Espectro de RMN ¹ H do experimento 5 do processo in situ a partir da biomassa úmida	93
Figura 35 Gráfico de barras das variáveis resposta rendimento mássico (%m/m) e conversão em ésteres etílicos (%EE) para o processo in situ a partir da biomassa úmida.	94
Figura 36 Gráfico de barras da variável resposta Produção ($\text{kg ésteres} \cdot \text{L meio}^{-1} \cdot \text{kg biomassa}^{-1}$) para o processo in situ a partir da biomassa úmida.	95
Figura 37 Gráficos de efeitos principais para as médias de %m/m do processo in situ a partir da biomassa úmida.....	97
Figura 38 Gráficos de efeitos principais para as médias de %EE do processo in situ a partir da biomassa úmida.....	100
Figura 39 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 1 Matriz L4 A	116

Figura 40 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 2 Matriz L4 A	116
Figura 41 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 3 Matriz L4 A	117
Figura 42 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 4 Matriz L4 A	117
Figura 43 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 1 Matriz L4 B	118
Figura 44 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 2 Matriz L4 B	118
Figura 45 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 3 Matriz L4 B	119
Figura 46 Espectro de RMN ¹ H - Experimento 4 Matriz L4 B	119
Figura 47 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 1	120
Figura 48 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 2	121
Figura 49 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 3	122
Figura 50 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 4	123
Figura 51 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 5	124
Figura 52 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 6	125
Figura 53 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 7	126
Figura 54 Espectro de RMN ¹ H do processo in situ a partir da biomassa úmida - Experimento 8	127
Figura 55 Gráficos dos efeitos principais (a) para as médias e (b) para as Razões S/N	132
Figura 56 Espectro de RMN ¹ H da amostra do ensaio 5 da matriz experimental	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição bioquímica de microalgas em relação a matéria seca (% peso seco)	28
Tabela 2 Publicações de transesterificação in situ em biomassa de microalgas ..	38
Tabela 3 Matriz experimental L8 de Taguchi com sete fatores e dois níveis.	54
Tabela 4 Reagentes do meio Guillard f/2 sem sílica	57
Tabela 5 Matriz experimental L4 de Taguchi com três fatores e dois níveis.	71
Tabela 6 Fatores e níveis do processo in situ para as razões etanol/biomassa 50mL/g e 100mL/g (Matriz L4 A)	70
Tabela 7 Fatores e níveis do processo in situ para as razões etanol/biomassa 10mL/g e 25mL/g ((Matriz L4 B)	71
Tabela 8 - Fatores e níveis da do processo in situ a partir da biomassa úmida....	73
Tabela 9 - Matriz experimental L8 de Taguchi com sete fatores e dois níveis.	73
Tabela 10 Matriz experimental e resultados obtidos no processo in situ para as razões etanol/biomassa 100 mL/g e 50 mL/g (Matriz L4 A)	78
Tabela 11 Matriz experimental e resultados obtidos no processo in situ para as razões etanol/biomassa 25 mL/g e 10 mL/g (Matriz L4 B)	78
Tabela 12 Análise de Variância para as Médias de %m/m da Matriz L4 A	82
Tabela 13 Análise de Variância para as Médias de %m/m da Matriz L4 B	84
Tabela 14 Carga do reator e concentração de ácido sulfúrico em cada condição experimental para TEIS a partir da biomassa seca.	85
Tabela 15 Resultados obtidos no processo in situ a partir da biomassa úmida....	90
Tabela 16 Análise de Variância para as Médias de %m/m do processo in situ a partir da biomassa úmida.....	97
Tabela 17 Análise de Variância para as Médias de %EE do processo in situ a partir da biomassa úmida.....	100
Tabela 18 - Fatores e níveis da reação de transesterificação utilizando metanol e pré-tratamento em ultrassom.....	128
Tabela 19 - Matriz experimental L8 de Taguchi com sete fatores e dois níveis. .	129
Tabela 20 Matriz experimental e resultados obtidos na transesterificação in situ com a utilização de metanol e pré-tratamento em ultrassom.....	129

Tabela 21 Análise de Variância para as Média e razão Sinal/Ruído da Matriz Experimental na transesterificação in situ com a utilização de metanol e pré-tratamento em ultrassom	131
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
1.1	Objetivo Geral.....	20
1.2	Objetivos Específicos	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Contextualização	23
2.1.1	Consumo Energético	23
2.1.2	Impacto Político-Social sobre o Biodiesel	26
2.2	Microalgas.....	27
2.3	Biocombustíveis de Microalgas	29
2.3.1	Obstáculos para produção de biodiesel de microalgas	30
2.4	Biodiesel	31
2.4.1	Transesterificação “ <i>in situ</i> ” (TEIS)	33
2.5	Subprodutos da produção de biodiesel de microalgas	48
2.6	Biorefinaria.....	49
2.7	Planejamento de Experimentos	52
2.7.1	Metodologia de Taguchi	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	Metodologia do Trabalho.....	56
3.2	Cultivo das Microalgas	57
3.3	Processo de transesterificação <i>in situ</i>	60
3.4	Processo de duas etapas.....	63
3.4.1	Extração de Lipídios	63
3.4.2	Reação de Transesterificação	64
3.5	Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H).....	64
3.6	Quantificação de Ésteres Etílicos Brutos.....	65
3.6.1	Rendimento mássico (%m/m)	65
3.6.2	Conversão em Éster Etílico (% EE)	66
3.7	Planejamento Experimental	67
3.7.1	Processo <i>In situ</i> a partir da biomassa seca.....	68
3.7.2	Processo <i>In situ</i> a partir da biomassa Úmida.....	71

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	Processo em duas etapas (Extração – Transesterificação)	75
4.1.1	Percentual de lipídios	75
4.1.2	Conversão em ésteres etílicos	75
4.2	Processo <i>In situ</i> a partir da biomassa Seca (Estudo Exploratório).....	77
4.2.1	Análise Estatística	81
4.3	Processo <i>In situ</i> a partir da biomassa Úmida	90
4.3.1	Análise estatística.....	96
4.3.2	Desempenho de Produção.....	101
5	CONCLUSÕES	103
6	RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXO A – Espectros de RMN ¹ H do processo de TEIS a partir da biomassa seca.....	116
	ANEXO B – Espectros de RMN ¹ H do processo de TEIS a partir da biomassa úmida	120
	APÊNDICE A - TEIS a partir da biomassa seca utilizando metanol e pré- tratamento em ultrassom.....	128
	A.1 Condições experimentais.....	128
	A.2 Matriz experimental L8 de Taguchi	128
	A.3 Resultados	129
	A.3.1 Análise Estatística.....	130
	A.3.2 Análise de RMN ¹ H	132
	A.4 Conclusões.....	133

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O crescimento das demandas de alimentos, energia e água são consequências do rápido crescimento da população humana tornando-se um desafio em escala global para as próximas décadas (LÖFFLER et al., 2010). Segundo o relatório mundial das Nações Unidas sobre o desenvolvimento dos recursos hídricos (WWAP, 2012), é previsto que em 2030 a nossa sociedade irá necessitar de 35% a mais de alimento, 40% a mais de água e 50% a mais de energia.

Em função disto, encontrar fontes alternativas de produção de energia que não competem com a produção de alimentos e que reduzam o consumo de água, será uma opção para atender parte destas demandas. Atualmente, vários estudos demonstram que o cultivo de microalgas é um caminho viável para se produzir biocombustíveis sem interferir nas demandas de água e energia.

As microalgas são microrganismos por crescerem de maneira rápida em meios adversos, como águas residuais, águas contaminadas e águas salobras, e, também, por algumas espécies apresentarem a capacidade de acumular grandes quantidades de óleo. Portanto, é possível a produção de vários biocombustíveis a partir da sua biomassa. Apesar das vantagens da biomassa de microalgas como matéria prima para a produção de biocombustíveis, estes ainda permanecem em escala laboratorial devido a desafios técnicos como o melhoramento genético de cepas para maior produtividade, desenvolvimento de meios de cultivos mais eficientes, otimização dos processos de colheita, secagem, extração e conversão em biocombustíveis, que ainda demandam alto consumo de energia. Logo, estes desafios técnicos necessitam ser eliminados como forma de torna-lo econômico e sustentável.

Neste contexto, este trabalho estudou a reação de transesterificação do óleo da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* de maneira direta (*in situ*), dispensando a prévia extração de lipídios, realizando a extração concomitantemente junto a reação de transesterificação. Buscou-se com este processo a simplificação da produção de ésteres de ácido graxos, tendo em vista a produção de biodiesel, reduzindo as etapas de operações unitárias, consumo de solventes orgânicos, e sem a utilização de tecnologias sofisticadas e onerosas.

1.1 Objetivo Geral

Este trabalho dedicou-se à avaliação da reação de transesterificação da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* em meio ácido e *in situ* (processo que dispensa a etapa de extração de lipídios) a partir de matrizes experimentais de Taguchi. Buscou-se a minimização do tempo e temperatura de trabalho do reator e, principalmente, a redução de solventes orgânicos que são largamente utilizados na tradicional produção de biodiesel.

1.2 Objetivos Específicos

Em específico, os objetivos são:

- 1) Estudar os efeitos da razão etanol/biomassa, razão ácido sulfúrico/biomassa e clorofórmio/biomassa na transesterificação *in situ* (TEIS) da biomassa seca da microalga *Chlorella minutissima* e determinar melhores ajustes utilizando duas matrizes L4 de Taguchi, tendo como variável resposta o rendimento em massa e percentual de conversão em ésteres etílicos;
- 2) Estudar os efeitos da razão etanol/biomassa, concentração de ácido, tipo de ácido (HCl e H₂SO₄), proporção de clorofórmio para a TEIS da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* empregando biomassa úmida (84% em base seca) utilizando uma matriz L8 de Taguchi.

A Figura 1 contém o fluxograma do trabalho com os objetivos específicos, informando a matriz de Taguchi utilizada e as variáveis estudadas em cada caso.

Figura 1 Fluxograma das etapas de trabalho e suas respectivas matrizes e variáveis de estudo.

Fonte: Próprio autor

Inicialmente, após revisão bibliográfica e definição dos parâmetros reacionais, foi realizado um estudo preliminar do processo de TEIS (Apêndice A) utilizando-se metanol como reagente e fazendo-se um pré-tratamento em ultrassom, estudo paralelo para a análise da sensibilidade das variáveis. Após, buscando-se atender ao apelo ecológico, o metanol foi substituído nas demais etapas deste trabalho pelo etanol (menos tóxico e de origem renovável). Fez-se, então, o estudo da TEIS a partir da biomassa seca utilizando-se duas matrizes L4 de Taguchi (Matriz L4A e Matriz L4B) com o objetivo de avaliar diferentes razões etanol/biomassa distribuídas nas duas matrizes experimentais. Subsequentemente, com base nos resultados do estudo anterior com a biomassa seca, o estudo da TEIS a partir da biomassa úmida utilizou uma matriz L8 de Taguchi com o objetivo avaliar dois diferentes catalisadores ácidos (HCl e H₂SO₄) com a biomassa da microalga contendo 84% de umidade em base seca. De posse dos resultados, foi possível discutir os resultados e assim obter conclusões sobre o processo de TEIS para a biomassa da microalga *Chlorella minutissima*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contextualização

2.1.1 Consumo Energético

O consumo global de energia no último século foi fortemente baseado no consumo de energia fóssil, o que acelerou as emissões de CO₂ na atmosfera representando 63% dos gases de efeito estufa (HATTAB; GHALY, 2015). É estimado que as reservas de petróleo, gás e carvão natural sejam extintas em 50 anos, 52 anos e 114 anos, respectivamente, com a atual taxa de consumo destes combustíveis fósseis (BP GLOBAL, 2016).

É previsto o aumento no consumo de energia renovável e gás natural como mostra o gráfico da Figura 2. A maior parte desse crescimento é do setor de energia elétrica tendo a energia hídrica como maior responsável, porém, ainda é esperado crescimento de 3,1% ao ano no uso de biomassa para produção de energia (US Energy Information Administration, 2015).

Este interesse em produção de energia derivada de biomassa vegetal vem sendo desencadeado por fatores como: preocupações ambientais em reduzir as emissões de gases de efeito estufa, esgotamento de reservas de petróleo e instabilidades nos preços de petróleo devido à tensões geopolíticas no Oriente Médio (KASIM; HARVEY; ZAKARIA, 2010).

Dessa maneira, o biodiesel tem papel importante nas políticas energéticas do país. Não em substituir o diesel de petróleo, mas de trazer impactos positivos sobre o meio ambiente e políticas governamentais (Pacific Biodiesel, 2016). No Brasil, de acordo com o Ministério de Minas e Energia, a produção de biodiesel de 2014 a 2015 teve um aumento de 19,2% (BRASIL, 2016).

Figura 2 Consumo de energia por combustível previsto até 2040

Fonte: US Energy Information Administration, 2015

No entanto, atualmente, fontes de óleos comestíveis são mais facilmente disponíveis e largamente produzidos para o consumo humano como mostra a Figura 3, sendo que 60% dos óleos produzidos tem sido utilizados como fonte de alimento (GO et al., 2016). E, como aponta o autor, aumentar a fonte de óleo não-comestível resolveria em parte o problema, pois ainda assim, haveria concorrência da utilização da terra, além de ter como desvantagem a sua disponibilidade e estabilidade da produção destas matérias-primas.

Analisando a produção de biodiesel, em específico, o perfil nacional de produção de biodiesel tem o domínio do óleo de soja como matéria prima, como mostra o gráfico da Figura 4.

Figura 3 Produção mundial anual de óleo

Fonte: adaptado (GO et al., 2016)

Figura 4 Perfil Nacional de matérias-primas para produção de biodiesel em dezembro de 2015

Dezembro/ 2015

Fonte: Agência Nacional do Petróleo (2016)

Chisti (2015) aponta critérios básicos para a seleção de matérias primas para produção de biocombustíveis sustentável:

[...] A matéria prima adequada para o biodiesel deve satisfazer, no mínimo, os seguintes critérios: ela não deve ser um óleo alimentar, tais como óleos de soja, canola, milho e óleo de palma; sua produção não deve ocupar terras

agrícolas de produção de alimentos e de forragens para criação de animais; sua produção não deve causar desmatamento ou perda de outro habitat crítico; o seu custo de produção não deve ser maior que o de óleo de palma; seu rendimento por hectare por ano deve, pelo menos, ser igual ao melhor rendimento possível para o óleo de palma, mas de preferência deve ser muito maior; sua produção deve exigir valores mínimos em termos de fertilizantes, pesticidas, mão de obra e da água; e sua produção deve ser socialmente sustentável. (CHISTI, 2015, tradução nossa)

Consequentemente, a produção brasileira de biodiesel não atende a esses critérios, pois cerca de 98% da matéria prima para o biodiesel é cultivada em áreas de produção de alimentos.

Chisti (2015), ainda, afirma que esses critérios não são facilmente atingidos, porém, a microalga é um candidato em potencial para uma produção sustentável de biocombustíveis.

Apesar das microalgas, basicamente, cumprirem os pré-requisitos de uma matéria prima de biocombustível sustentável ainda existem vários desafios relacionados ao alto consumo de energia e custos dos processos de cultivo e conversão envolvidos, fatores estes que atrasam a produção em larga escala de biocombustíveis de microalgas (BROWNBRIDGE et al., 2014). Estes argumentos causam má percepção na sociedade e a aceitação por sua parte também é um desafio (ANUAR; ABDULLAH, 2016).

2.1.2 Impacto Político-Social sobre o Biodiesel

Hoje, o setor de transportes tem grande demanda por diesel de petróleo e é considerado a principal fonte de poluição da atmosfera (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). O biodiesel aparece neste cenário como um combustível alternativo (SILVA et al., 2015), porém este setor irá sofrer alterações significativas relacionadas à substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

Grandes consumidores de biodiesel, como Estados Unidos, Alemanha e Espanha, consomem mais que sua atual produção anual, gerando uma lacuna entre a demanda e a capacidade, que abre espaço para melhorias que exigem intensas pesquisas a fim de atender de forma realista estas demandas e usar recursos e tecnologias disponíveis de forma eficiente (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

Embora a produção de biodiesel ocasione um impacto positivo na utilização de recursos não renováveis, esta indústria tem sido atingida por equívocos e preconceitos (ANUAR; ABDULLAH, 2016). Em alguns momentos, como afirma Petkov et al. (2012), existem fortes exigências para a introdução de fontes de energias renováveis, porém, isto resulta em pesquisas com expectativas irreais e que acabam superestimando o saldo de investimentos e retornos esperados na produção de biodiesel, por exemplo. Assim, é comum o enfoque nos inconvenientes de cada processo de produção da matéria prima ou do biodiesel, ocasionando o desencorajamento de sua produção e utilização (GO et al., 2016). Por consequência, a aplicação de biodiesel ainda é questionável e discutível com alguns argumentos que causam percepção ruim na sociedade e a aceitação por parte da sociedade e governantes ainda é um desafio a ser superado (ANUAR; ABDULLAH, 2016). No entanto, estes inconvenientes deveriam ser tomados de forma positiva nas pesquisas científicas de modo a alcançar meios de integrar e maximizar a utilização do biodiesel em cenários onde ele é mais adequado (GO et al., 2016). Reafirmando a necessidade de incentivos governamentais a este ramo de pesquisa de grande potencial

2.2 Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos procarióticos ou eucarióticos que podem crescer rapidamente e viver em condições adversas devido à sua estrutura multicelular ou unicelular (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010)

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes, não apenas aquáticos, mas também terrestres (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; TOMASELLI, 2004). Estima-se que existam cerca de 300.000 espécies, cuja diversidade é muito maior do que a das plantas terrestres (SCOTT et al., 2010).

Embora, geralmente, sejam de vida livre, um certo número de microalgas vive em associação simbiótica com uma variedade de outros organismos (TOMASELLI, 2004).

Comumente, para a produção em larga escala de biomassa, o cultivo de uma espécie isolada ocorre em meio aquático. Chisti (2007) explica que este meio fotossintético para produção em larga escala exige luz, água, dióxido de carbono e sais inorgânicos, elementos inorgânicos que constituem a célula algácea como nitrogênio (N), fósforo (P), ferro e, em alguns casos, silício.

A biomassa de microalgas possui três principais componentes bioquímicos: carboidratos, proteínas e lipídios (RAWAT et al., 2013). A Tabela 1 descreve a composição geral de algumas microalgas.

Tabela 1 Composição bioquímica de microalgas em relação a matéria seca (% peso seco)

Microalga	Proteína	Carboidrato	Lipídio
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Brotryococcus brauni</i>	40	2	33
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella minutissima*</i>	62,3	27,6	9,2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Pseudochoricystis ellipsoidea</i>	27,5	19,3	45,4
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8–18	21–52	16–40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Spirioyra sp.</i>	6–20	33–64	11–21
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

*cultivada em meio Conway

Fonte: Adaptado de Campos; Barbarino; Lourenço (2010), Gupta; Malik; Bux (2017) e Spolaore et al. (2006)

As porções desses componentes bioquímicos variam conforme a espécie e, também, são influenciados pelas condições do meio de cultivo como intensidade de luz, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes. Como visto na Tabela 1, com base em sua composição química, a biomassa de microalgas podem adequar-se como matéria prima para diferentes tipos de combustíveis renováveis, como biodiesel, metano, hidrogênio, etanol, e outros (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

2.3 Biocombustíveis de Microalgas

A produção de biocombustíveis a partir do cultivo de microalgas tem se tornado relevante visto que microalgas não competem com fontes de alimentos como, a soja ou o milho, por exemplo (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2015), e podem ser cultivadas nos mais diferentes locais, inclusive em regiões áridas, em diferentes meios de cultivos como meios com alto teor de íons de metais pesados, com a presença de substâncias tóxicas e/ou, também com elevada concentração de CO₂ (KIM et al., 2014). E, também, as microalgas são conhecidas por possuírem alta de crescimento e produtividade em biomassa, alto rendimento específico por área e alta eficiência fotossintética (LOONG; IDRIS, 2016; POSTEN; WALTER, 2012)

Além das vantagens citadas, as microalgas, também, acumulam óleo rapidamente e crescem utilizando dióxido de carbono. Em comparação com plantas oleaginosas, é possível obter maiores quantidades de óleo com microalgas cultivadas em uma mesma área de cultivo.(SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Isso porque as microalgas são organismos fotossintéticos que fixam CO₂ de maneira mais eficiente que plantas terrestres.(NELSON; VIAMAJALA, 2016). Como apontado por Nelson e Viamajala (2016), a produção de biocombustíveis derivados da biomassa de microalgas tem a expectativa de proporcionar um rendimento de 10 a 100 vezes mais por acre de terra comparado à outras culturas.

Devido à escassez de água doce em diversas regiões do mundo, as espécies de microalgas marinhas têm se tornado vantajosas, como é o caso da *Chlorella minutissima*, pois cresce naturalmente em água salgada, podendo, portanto, ser cultivada com a utilização da própria água do mar (KWIETNIEWSKA et al., 2012). Além de não impactar o mercado agrícola e alimentar existentes (NELSON; VIAMAJALA, 2016) e pode ser colhida continuamente ao longo do ano (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016).

Em consequência disto, torna-se vantajoso o cultivo desta, e de espécies semelhantes de microalgas, como fonte renovável na produção de biocombustíveis. Porém, como destaca Anuar e Abdullah (2016), deve-se avaliar o impacto da indústria do biodiesel ao meio ambiente. Apresentando, assim, obstáculos na produção de biodiesel de microalgas.

2.3.1 Obstáculos para produção de biodiesel de microalgas

Apesar das vantagens do óleo de microalgas como matéria prima para a produção de biodiesel, o biodiesel de microalgas ainda está em escala laboratorial devido a desafios técnicos que precisam ser superados para torná-lo econômico e sustentável.

As principais limitações do uso industrial de microalgas são alta demanda de energia e custos de cultivos e preparação para a produção de combustível (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Inclusive, o alto custo é devido aos vários estágios de *downstream* envolvidos como colheita, filtração, secagem, extração, separação e processos de transesterificação (LOONG; IDRIS, 2016). Estes obstáculos limitam a expansão deste tipo de indústria, pois existe uma demanda por mudanças relacionadas ao uso de novas matérias primas e tecnologias avançadas (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Industrialmente, o retorno do investimento de uma planta de produção de biodiesel é altamente sensível ao conteúdo de óleo da biomassa de microalgas como mostra a Figura 5 do estudo feito por Brownbridge et al. (2014) em que o conteúdo em óleo é o parâmetro mais sensível ao custo final (64% do impacto no custo final é em consequência do conteúdo de óleo).

Figura 5 Sensibilidade global do custo de produção de biodiesel de microalgas

Fonte: Adaptado de Brownbridge et al. (2014)

Logo, estudos para a produção de biocombustíveis de microalgas devem abranger do cultivo até a síntese com objetivo de garantir altos níveis de rendimentos e estabilidade no conteúdo em óleo da biomassa produzida, para favorecer o capital investido neste tipo de indústria.

2.4 Biodiesel

O biodiesel é reconhecido como um combustível líquido atrativo que apresenta benefícios como, por exemplo, ser renovável, não tóxico e biodegradável, o que representa menos emissões de poluentes para o meio ambiente em relação ao uso de diesel mineral (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016; SUGANYA et al., 2016) Todavia, o custo de produção de biodiesel continua a ser elevado em comparação ao de combustível diesel derivado do petróleo.

O termo biodiesel é frequentemente usado para se referir aos ésteres produzidos na transesterificação de lipídios oriundos de biomassa renovável. Duas reações podem acontecer no processo de produção de biodiesel. O material lipídico extraído da biomassa de microalgas contém altas quantidade de ácidos graxos, como apresentado por Viêgas et al. (2015), que demonstra ser um óleo de acidez elevada. Então, durante o processo reativo destes óleos de alta acidez, podem ocorrer duas reações, a esterificação destes ácidos graxos, apresentada na Figura 6, e também a transesterificação dos lipídios, tecnicamente nomeado de triglicerídeos (VÖLZ, 2009), apresentado na Figura 7.

Figura 6 Reação de esterificação de ácido graxo

Fonte: Adaptado de Volz (2009)

Figura 7 Reação de transesterificação de triglicerídeos

* O catalisador pode ser ácido ou básico

Fonte: Adaptado de Volz (2009)

O processo de esterificação e transesterificação envolve, respectivamente, a reação dos ácidos graxos e acilglicerídeos oriundos de plantas ou animais, com álcoois de baixa massa molecular com a presença de catalisador (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016a). Em ambas reações se tem a utilização de catalisador que, na reação de esterificação dos ácidos graxos, deve ser via catalise ácida, caso contrário, tem-se uma reação de saponificação. Já para a reação de transesterificação dos triglicerídeos a catálise pode ser ácida ou básica. No entanto, a escolha da catálise básica ou ácida para um determinado óleo vegetal estará intrínseco ao seu índice de acidez. Óleos vegetais com índice de acidez até 3 mg KOH g⁻¹ podem ser catalisados por bases pois as perdas por saponificação não serão significativas (VÖLZ, 2009). A formação dos ésteres (biodiesel) acontece nas duas etapas, porém na reação de transesterificação gera a glicerina como subproduto. Enquanto para a reação de esterificação produz-se água como subproduto. Logo, como a reação é de equilíbrio, qualquer presença de água no meio reacional tem se o deslocamento da reação para a formação dos ácidos graxos e álcool.

Quimicamente, a transesterificação de óleos de origem renovável é uma das maneiras mais eficazes e uma das etapas mais importantes para se produzir um combustível limpo e ecológico (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2015).

Tipicamente, o processo de produção de biodiesel envolve a extração de óleos ou lipídios de biomassas, que posteriormente serão processadas para produzir biodiesel, denominado assim, processo de duas etapas. Para tanto, hoje, as indústrias necessitam de tecnologias para extração e purificação do óleo, que se estima impactar em 70 a 80% no custo de produção. (GO et al., 2016).

Consequentemente, o processamento de maneira direta de biomassas parece ser uma alternativa economicamente viável visto que resulta em economia de recursos no processo de produção. A este uso direto da biomassa no reator se denomina Transesterificação Direta ou “*In Situ*”.

O processo de Transesterificação *In situ* surge como uma alternativa viável para este problema pois faz uso direto da matéria prima sem a necessidade de priorizar a extração do óleo.

2.4.1 Transesterificação “*in situ*” (TEIS)

A transesterificação direta ou “*in situ*”, expressão do latim que significa “no local”, vem se destacando por realizar a extração dos lipídios e a reação de transesterificação de maneira concomitante, em uma única etapa do processo. Atualmente, o processo vem sendo intitulado como Processo de Extração Reativa.

Como apresentado no trabalho de Go et al. (2016), os primeiros estudos da transesterificação *in situ* de óleo é datada de 1985 e a próxima publicação, envolvendo este processo, aparece em 1998, ganhando mais interesse dos pesquisadores entre 2006 e 2007, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 Pesquisas e publicações de TEIS desde 1985 a 2015

Fonte: Go et al. (2016)

Segundo Go et al. (2016), uma possível razão do aumento de interesse na TEIS seja devido à redução de custos na produção de biodiesel quando comparado ao processo convencional. Os autores afirmam que a utilização de lipídios refinados como matéria prima de biodiesel abrange cerca de 70% dos custos totais de operação na produção de biodiesel.

Logo, a TEIS da biomassa de microalgas mostra-se como uma alternativa em potencial na redução dos custos de produção de biodiesel microalgal por eliminar a necessidade de etapas como pré-tratamento da biomassa possibilita a extração dos lipídios e purificação, que vem sendo o principal fator de impedimento no avanço desta indústria; minimizar o consumo elevado de solventes e tempo operacional (LEWIS; NICHOLS; MCMEEKIN, 2000). A eliminação da etapa de extração de lipídios não reduz somente etapas de produção mas também resulta em um menor custo de investimento inicial, de instalação de equipamentos e manutenção, e energia (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

2.4.1.1 Mecanismo do Processo de TEIS em biomassa microalgal

Vários mecanismos são propostos para a TEIS (Figura 9). Segundo Go et al. (2016), a hipótese mais aceita é a de que o mecanismo envolve a difusão do álcool através da parede celular e reage com os lipídios dentro da célula, (Figura 9 a), bem como a dissolução dos lipídios para o meio reacional tanto pelo efeito do inchaço da estrutura celular (Figura 9 b), devido a presença de água no meio reacional quando utilizado biomassa úmida (COHEN, 1999), ou pela quebra da parede celular que expõe os lipídios para o meio reacional (Figura 9 c). Cada um dos mecanismos ocorrem em grau diferentes conforme a característica da biomassa envolvida.

Figura 9 Mecanismo do processo de Transesterificação *In situ*; (a) difusão dos reagentes através da parede celular; (b) difusão dos lipídios e ácidos graxos para o meio reacional; (c) difusão dos lipídios e ácidos graxos através da parede celular rompida.

Fonte: Próprio autor

2.4.1.2 Fatores envolvidos no processo de Transesterificação *In situ*

Como relata Skorupskaite e colaboradores (2016), a tecnologia *in situ* pode ser aplicada a praticamente qualquer matéria prima de origem vegetal ou resíduos. No entanto, deve ser dada atenção as características da biomassa

como umidade, tamanho de partícula, composição em óleo, teor de acidez e condições de reação (conteúdo de reagentes e catalisador, tempo de reação, temperatura, etc.).

Os fatores que evidenciaram significativa influência na síntese *in situ* de produção de biodiesel, em diferentes publicações da literatura e resultados obtidos, são apresentados na Tabela 2. Os fatores volumétricos (álcool, ácido e co-solvente) foram padronizados em mL por grama de biomassa como forma de melhorar a comparação dos trabalhos. Os níveis destes fatores, no melhor ajuste, divergem de autor para autor justificando uma melhor investigação dos parâmetros da reação de transesterificação *in situ*.

Ehimen, Sun e Carrington (2010) investigaram isoladamente os parâmetros de volume de álcool x temperatura, tempo de reação, agitação e umidade. Desta maneira, determinaram que o sistema deve ser continuamente agitado trabalhando com 4mL de metanol por grama de biomassa a 90°C em 1 hora de reação para se ter uma conversão de lipídios de 92% utilizando uma quantidade fixa de ácido sulfúrico de 0,15 mL por grama de biomassa.

Lemões (2011) investigou o rendimento utilizando o metanol e etanol na conversão direta de lipídios. No entanto, o rendimento não variou significativamente quando aplicado a rota metílica ou etílica no processo, sendo, apenas, confirmado que o aumento na temperatura de reação de 60°C para 100°C apresentou um maior rendimento na conversão, saltando de 89,8% para 98,2%.

Gaivão (2013) obteve uma conversão de 95% realizando a reação com 40 mL de metanol por grama de biomassa e 0,5 mL de ácido por grama de biomassa em 6 horas de reação a 50°C, porém quando utilizado um pré-tratamento do tamanho de partícula o tempo de reação decresceu para 4 horas de reação.

Trevisan et al. (2013) avaliou o rendimento utilizando dois diferentes solventes, hexano e clorofórmio, na reação de transesterificação *in situ*. Foi observado pelo autor que a maior produção de biodiesel ocorre com a utilização do hexano como co-solvente, assim, cerca de 110 mg de biodiesel por grama de biomassa foi produzido em 100 minutos de reação a 90°C.

Viêgas et al. (2015), por sua vez, avaliou os efeitos dos níveis de ácido no meio reacional e sua interação com a temperatura durante a conversão direta da biomassa. O autor relata que para uma quantidade de 20% em massa de ácido,

em relação à massa de biomassa, a variação de temperatura de 60° para 100°C para o tempo de 4 horas, ambas condições apresentam aproximadamente 98% de conversão, mas que para o tempo de 2 horas há um pequeno aumento no rendimento de 3% de conversão na mesma elevação de temperatura. Ainda, Viêgas et al. (2015) menciona que o uso de grandes quantidades de ácido sulfúrico utilizado na transesterificação *in situ* não é economicamente viável e é necessário mais pesquisa para a otimização do processo.

Os resultados acima citados foram obtidos com uso da biomassa seca, sendo, então, necessária a etapa de secagem da biomassa ao longo do processo produtivo do biodiesel. Para Ehimen, Sun e Carrington (2010), em um processo com baixa razão álcool/biomassa e sem a utilização de co-solventes, o aumento da umidade da biomassa na entrada do processo, atenuou a conversão de lipídios, sendo que, para umidades acima de 31,7% é apontado como limite para que a síntese *in situ* ocorra. Ou seja, a partir desse valor ocorre a inibição completa da reação de transesterificação *in situ* pela água presente na biomassa em um processo com baixa quantidade do álcool e sem a presença de co-solventes no meio reacional.

No entanto, é notado que há um crescente número de trabalhos avaliando o processo *in situ* utilizando a biomassa úmida, com teores de umidade variando de 65% a 80% (Tabela 2), indicando um maior interesse em descartar a etapa de secagem da biomassa pois a eliminação desta etapa representa economia de recursos e energia do processo viabilizando a produção de biodiesel de microalgas. Neste contexto, Im et al. (2014) demonstram a necessidade do co-solvente para se trabalhar com biomassa úmida e da existência da proporcionalidade direta entre a polaridade do solvente e o rendimento do processo. Segundo os autores, os solventes de maior polaridade apresentaram os maiores rendimentos da síntese *in situ*. O autor afirma que concentrações de ácido maiores que 0,3mL/grama de biomassa e tempos superiores a 90 minutos não apresentam aumento significativo de rendimento. Utilizando as condições descritas acima, biomassa com 65% de umidade e temperatura de reação de 95°C, foi possível converter, por rota metílica, 91% dos lipídios presentes na biomassa.

Tabela 2 Publicações de transesterificação *in situ* em biomassa de microalgas

Referência	Microalga	Umidade (%)	Rota	Álcool/ biomassa (mL/g)	Ácido	Ácido/ biomassa (mL/g)	Co-Solvente	Co-solvente/ biomassa (mL/g)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pré-tratamento	Rendimento (% m/m)
Johnson; Wen, (2009)	<i>Schizochytrium limacinum</i>	0,0%	Metílica	3,6	H ₂ SO ₄	0,40	Clorofórmio	4,00	90,0	40,0	-	72,8
Johnson; Wen, (2009)	<i>Schizochytrium limacinum</i>	80,0%	Metílica	3,6	H ₂ SO ₄	0,40	Clorofórmio	4,00	90,0	40,0	-	8,5
Carvalho (2010)	<i>Nannochloropsis Oculata</i>	0,0%	Metílica	85,0	HCl	8,50	Clorofórmio	8,50	80,0	120,0	-	0,2307*
Ehimen; Sun; Carrington (2010)	<i>Chlorella sp</i>	0,0%	Metílica	4,0	H ₂ SO ₄	0,15	-	-	60,0	120,0	-	92,0
Haas; Wagner (2011)	N/I	0,0%	Metílica	5,6	H ₂ SO ₄	0,50	-	-	65,0	120,0	-	86,0
Haas; Wagner (2011)	N/I	7,6%	Metílica	5,6	H ₂ SO ₄	0,50	-	-	65,0	120,0	-	80,0
Lemões (2011)	<i>Chlorella sp</i>	0,0%	Metílica	3,0	H ₂ SO ₄	0,10	-	-	100,0	240,0	-	98,2
Lemões (2011)	<i>Chlorella sp</i>	0,0%	Etílica	3,0	H ₂ SO ₄	0,10	-	-	100,0	240,0	-	93,9
Wahlen; Willis; Seefeldt (2011)	<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,0%	Metílica	20,0	H ₂ SO ₄	0,36	-	-	80,0	20,0	-	82,0
Gaivão (2013)	<i>Nannochloropsis sp</i>	0,0%	Metílica	40,0	H ₂ SO ₄	0,48	-	-	50,0	360,0	Redução de partícula	95,0
Trevisan et al. (2013)	<i>Chlorella Vulgaris</i>	0,0%	Etílica	125,0	HCl	12,50	Hexano	12,50	90,0	100,0	-	0,1068*
Im et al. (2014)	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	65,0%	Metílica	5,0	H ₂ SO ₄	1,00	Clorofórmio	10,00	95,0	90,0	-	91,0
Kim et al. (2014)	<i>Scenedesmus sp</i>	0,0%	Metílica	15,0	H ₂ SO ₄	0,75	-	-	70,0	600,0	-	48,4

* g/g de biomassa
(Continua)

(Continuação)

Tabela 2 Publicações de transesterificação *in situ* em biomassa de microalgas

Referência	Microalga	Umidade (%)	Rota	Álcool/ biomassa (mL/g)	Ácido	Ácido/ biomassa (mL/g)	Co-Solvente	Co-solvente/ biomassa (mL/g)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pré-tratamento	Rendimento (% m/m)
Nautiyal; Subramanian; Dastidar (2014)	<i>Spirulina platensis</i>	0,0%	Metílica	4,0	H ₂ SO ₄	0,22	-	-	55,0	90,0	-	75,0
Procópio (2014)	<i>Isochrysis Galbana</i>	0,0%	Metílica	50,0	HCl	5,00	Clorofórmio	5,00	90,0	60,0	-	67,6
Choi et al. (2015)	<i>Scenedesmus sp</i>	0,0%	Metílica	22,07	H ₂ SO ₄	1,10	Clorofórmio	23,2	70,0	600,0	-	59,1
Im; Kim; Lee (2015)	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	65,0%	Etílica	9,0	H ₂ SO ₄	4,50	Clorofórmio	3,00	125,0	120,0	-	94,0
Kim; Im; Lee (2015)	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	80,0%	Metílica	6,7	H ₂ SO ₄	2,13	Clorofórmio	4,67	95,0	120,0	-	89,8
Kim; Im; Lee (2015)	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	80,0%	Metílica	6,7	HCl	3,33	Clorofórmio	4,67	95,0	120,0	-	98,8
Kim et al. (2015c)	<i>Nannochloropsis salina</i>	76,5%	Metílica	13,1	H ₂ SO ₄	0,33	-	-	100,0	60,0	-	99,7
Kim et al. (2015c)	<i>Nannochloropsis salina</i>	76,5%	Etílica	6,5	H ₂ SO ₄	0,33	-	-	100,0	60,0	-	94,6
Suh et al. (2015)	<i>Ettla sp</i>	80,0%	Etílica	10,0	H ₂ SO ₄	0,33	-	-	80,0	30,0	Desidratação por solvente	70,0
Suh et al. (2015)	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	70,0%	Etílica	10,0	H ₂ SO ₄	0,33	-	-	80,0	120,0	Desidratação por solvente	110,0
Viêgas et al. (2015)	<i>Chlorella sp</i>	0,0%	Metílica	4,8	HCl	1,10	-	-	60,0	240,0	-	98,0
Karimi (2017)	<i>Chlorella sp</i>	80,0%	Metílica	3,0	H ₂ SO ₄	0,28	Clorofórmio	4,90	60,0	100,0	Ultrassom	87,7

* g/g de biomassa

Fonte: Próprio autor

Kim et al. (2015) trabalharam com a utilização de HCl na rota metílica da transesterificação *in situ* com uma biomassa com 80% de umidade, considerada altamente úmida pela literatura, 0,3 mL de ácido, 0,1 mL de clorofórmio apresentando um rendimento de 90%. Segundo o autor, o desempenho do HCl na reação não é afetado pelos altos níveis de umidade devido a maior afinidade deste ácido com a água tendo maior atuação na ruptura celular resultando, portanto, em menor uso de co-solvente.

Em outra publicação, Im et al. (2015), utilizando-se da rota etílica, aponta que há uma queda pequena de rendimento para umidades de 50% a 65%. Os autores obtiveram 94% de conversão de uma biomassa com 65% de umidade, com a proporção 6:2:3 (v/v/v) de etanol:clorofórmio:ácido respectivamente.

Por sua vez, Suh et al. (2015) avaliaram o pré-tratamento com álcool a partir de amostra com 80% de umidade resultando em 70% de conversão em apenas 30 minutos de reação para a microalga *Ettlia sp.* O autor aplicou a mesma condição experimental para a microalga *Nannochloropsis oceânica*, porém, estendendo o tempo de reação para 2 horas o qual resultou em uma conversão completa dos lipídios disponíveis na biomassa.

Salam, Velasquez-Orta e Harvey (2016a) utilizaram dodecil sulfato de sódio (DSS) e H_2SO_4 no meio reacional e atingiram um rendimento em biodiesel de 98,3% com uma biomassa com 20% de umidade, sendo somente notado uma diminuição no rendimento de biodiesel a partir de 30% de umidade.

Como visto, a efetividade da TEIS é influenciada por diversos parâmetros como quantidades de reagentes, temperatura, tempo de reação, umidade da biomassa e agitação. Assim, avaliar as interações entre estes fatores e selecionar uma condição ótima poderia aumentar significativamente o rendimento em biodiesel (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016) e viabilizar economicamente a produção do biodiesel de microalgas em escala industrial. Estes fatores são discutidos a seguir.

2.4.1.3 Meio Reacional

A conversão dos triglicerídeos em ésteres ocorre em meio catalisado com ácido ou base, no entanto, o óleo de microalgas é conhecido por possuir um alto teor de acidez, como encontrado por Miao e Wu (2006) de 8,97 mg KOH g⁻¹ para

a microalga *Chlorella protothecoides*. Segundo Thevenieau e Nicaud (2013), durante a acumulação de óleo forçada, condição de estresse onde se tem a privação de nutrientes no meio de cultivo como forma estimular a célula a sintetizar lipídios, ocorre a inibição da via metabólica da produção de proteína. Por consequência, a privação de nutrientes perturba esta via de metabólica na célula da microalga e acumula ácidos graxos, composto que participa desta biossíntese. Assim, a rota catalisada por ácido é a mais indicada para a síntese do biodiesel de microalgas, posto que a catálise alcalina é aplicável em índice de acidez menor que 3 mg KOH g^{-1} (VÖLZ, 2009) para que reações secundárias não ocorram, como a reação de saponificação.

Contudo, a catálise ácida, ainda apresenta rendimento relativamente baixo para a ampliação de escala por possuir um tempo de reação mais longo. No entanto, a incorporação de co-solventes, como hexano ou clorofórmio no meio reacional, contribui para a melhora do rendimento da reação, por auxiliar a extração dos lipídios no momento da reação melhorando a solubilidade entre o lipídio e álcool (HIDALGO et al., 2015a, 2015b). Conforme Go et al. (2016), um bom co-solvente deve permitir a redução do doador alquil, mantendo ou reduzindo a razão solvente/biomassa, porém, não deve ser usado em excesso visto que dilui o álcool na mistura reacional.

Do mesmo modo, agentes ou meios de ruptura podem ser empregados como forma de incrementar o rendimento da síntese como apresentado por Gaivão (2013) e Hidalgo et al. (2015a), que analisaram a ação da redução do tamanho de partícula da biomassa na síntese direta. Gaivão (2013) ainda avaliou o efeito da liofilização da biomassa como pré-tratamento. Soluções com íons de ferro, denominados reagentes de Fenton, podem ser utilizadas para a degradação da célula como apresentado por Kim et al. (2015) que mostrou a sinergia do efeito entre o íon Fe^{2+} e H_2O_2 no processo de extração. Seo et al. (2015) demonstram um ganho de eficiência nos resultados empregando pirita (FeS_2) oxidada no meio reacional da transesterificação. Kim et al. (2015a), também mencionam que a radiação ultrassônica é eficaz no rompimento da parede celular das microalgas.

2.4.1.4 Aceptor Acil

Os aceptores acil, ou doadores de alquila, mais utilizados são os álcoois de cadeia curta, que atuam como reagente e, também, como solvente no processo de TEIS. Os álcoois utilizados são metanol (rota metílica), etanol (rota etílica) ou butanol e cada qual apresenta um comportamento diferente nas reações de esterificação e transesterificação (VÖLZ, 2009).

O metanol é amplamente aplicado devido às razões comerciais e por sua característica físico-química de maior reatividade, menor cadeia carbônica (efeito estérico) e polaridade (miscibilidade) (ENCINAR; GONZÁLEZ; RODRIGUEZ-REINARES, 2005), tornando-o mais vantajoso em atingir rendimentos satisfatórios em baixas temperaturas e tempo de reação comparado aos outros álcoois (SILVA et al., 2015). Seu uso permite a separação espontânea do glicerol formado no meio reacional e apresenta teor de umidade inferior ao do etanol (GARCIA, 2006), sendo portanto, o mais aplicado nas reações de transesterificação.

Em contrapartida, o metanol é conhecido pela sua elevada toxicidade, enquanto o etanol é bem visto por ser um reagente renovável e menos tóxico. Desse modo o metanol pode ser substituído pelo etanol. No entanto, a rota etílica implica em problemas na separação do glicerol do meio reacional (GARCIA, 2006), em razão do etanol atuar como um surfactante na mistura reacional, promovendo uma dispersão estável do glicerol no biodiesel (emulsão estável) dificultando a separação de fase e aumentando o tempo de produção (SILVA et al., 2015). Dessa maneira são necessárias etapas adicionais para a separação do glicerol tais como: centrifugação auxiliada ou não pela adição de co-solventes (KUCEK, 2004), ou adição de misturas metanol:etanol ao termino da reação (SILVA et al., 2015).

Silva et al. (2015) propuseram a adição de pequena quantidade de água (1% v/v relativo ao volume total da mistura reacional) para facilitar o processo de separação. Segundo o autor, este fato pode ser entendido pela formação de ligações de hidrogênios entre o etanol e água que são energeticamente mais estáveis que as interações de Van der Waals entre o etanol e biodiesel, favorecendo a separação do glicerol do meio (SILVA et al., 2015).

A vantagem da rota etílica, é da grande oferta do etanol de cana de açúcar por todo território nacional influenciando nos custos de produção do biodiesel (SILVA et al., 2015; VÖLZ, 2009), além do ponto de vista ambiental de ser um reagente sustentável. Silva et al. (2015) ressalta que o metanol utilizado no país é importado, sendo uma desvantagem sob certas condições políticas e econômicas. Ademais, metanol é um solvente altamente polar e triglicerídeos são longas moléculas de hidrocarbonetos de baixa polaridade (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Logo, ácidos graxos dissolvem facilmente em metanol, porém os triglicerídeos são dificilmente solubilizados. Skorupskaite e colaboradores (2016) afirmam que a baixa miscibilidade do óleo em metanol pode promover a resistência da transferência de massa. Dessa forma o etanol é preferível devido a sua melhor solubilidade em triglicerídeos, por possuir menor polaridade (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

Em comparação à produção convencional de biodiesel, o processo de TEIS requer o uso de maiores volumes de álcool. Estequiométricamente, a proporção molar álcool:triglicerídeo é de 3:1, no entanto, na TEIS a reação é idealmente processada a uma proporção molar de 200:1 a 600:1 (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Assim, é pertinente a avaliação do tipo e quantidade de álcool na TEIS e seu efeito sob todo o processo.

2.4.1.5 Catalisador ácido

Durante a TEIS o catalisador ácido, além de catalisar a reação de síntese, facilita a fragmentação da parede celular das microalgas, garantindo maior acesso do álcool ao óleo contido na célula (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

Ácido sulfúrico é comumente utilizado e estudado quando metanol ou etanol atuam como doadores alquila. Poucos são os estudos com a utilização de ácido clorídrico como catalisador. No entanto, este ácido apresenta vantagens quando se utiliza biomassa com alta umidade. No estudo publicado por Kim, Im e Lee (2015), o HCl proporcionou maior efetividade como catalisador que o H_2SO_4 no processo de TEIS com biomassa úmida. O autor esclarece que a performance

do HCl não é afetada pela taxa de umidade da biomassa devido a alta afinidade com a água, possibilitando uma redução de custos.

Em geral, é necessária uma maior quantidade de ácido no processo de TEIS devido à alta quantidade de água na biomassa pois este fato reduziria a concentração de ácido na reação e dificultaria a interação solvente-lipídio (GO et al., 2016). Diante disso, tem-se a preocupação com a neutralização e recuperação deste catalisador no produto e meio reacional. A necessidade de neutralizar o catalisador presente no meio e o tempo de reação da catálise ácida pode elevar o custo de operação (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016b, 2016c). Kim, Im e Lee (2015) sustentam que a recuperação de HCl seria mais fácil que o H_2SO_4 devido ao baixo ponto de ebulição do HCl, possibilitando uma redução nos custos de produção.

Skorupskaite e colaboradores (2016) reportam que em altas concentrações de catalisador pode ser notada uma redução em produto de reação (biodiesel). Segundo os autores, isso se deve a polimerização dos ácidos graxos insaturados na presença de excesso de ácido, temperaturas elevadas (70°C) e nos longos períodos de reação (acima de 20 horas). E, segundo Nautiyal e colaboradores (2014) o aumento da concentração de catalisador leva à formação de emulsão e aumento da viscosidade, dificultando a recuperação do biodiesel.

2.4.1.6 Catalisador básico

O grande obstáculo da utilização de catalisador básico, não somente no processo de TEIS mas, também, no processo em duas etapas, é a elevada quantidade de ácidos graxos presentes na biomassa de microalgas. Com a catálise básica, em princípio, os ácidos graxos seriam saponificados, diminuindo o rendimento em ésteres. Em geral, a catálise ácida tem melhores efeitos no processo de TEIS que a catálise básica.

No entanto, SALAM e colaboradores (2016b), demonstram a possível utilização de catalisadores básicos por meio da transesterificação rápida que consiste em utilizar excesso de metanol com alta concentração de álcali mas por um período relativamente curto de reação, antes que a taxa de saponificação se torne significativa no processo. Segundo os autores a alta concentração de álcali

produz metóxidos que são altamente reativos e causam, então, grandes taxas de conversão. SALAM e colaboradores (2016b) obtiveram 96% de rendimento em ésteres metílicos em 10 minutos de reação com óleo de alta quantidade de ácidos graxos (6% em lipídios). Os experimentos mostraram bons rendimentos na utilização de biomassa úmida, portanto, maior tolerância do processo de TEIS a umidade da biomassa em meio básico.

Outra possibilidade, é a de que a catálise básica pode ser utilizada como segunda etapa no processo de TEIS. Para melhorar o rendimento da conversão da TEIS via catalise ácida pode-se efetuar uma segunda etapa com uma catálise básica pois praticamente todo ácido graxo já estará convertido em éster na primeira etapa (VÖLZ, 2009).

Salam e colaboradores (2016b) ainda ressaltam que a catálise alcalina é menos corrosiva que a catalise ácida, possui menor tempo de reação e trabalha em temperaturas menos elevadas. Estes fatos diminuem os custos de capital e operação do processo.

2.4.1.7 Sistema Reacional

O sistema reacional para o processo de TEIS basta somente que a agitação do meio reacional seja efetiva para manter a biomassa suspensa (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016a), para que haja uma dispersão homogênea do solvente líquido e da biomassa sólida no processo de TEIS (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016) ou seja, um reator perfeitamente agitado (RPA, ou do inglês, CSTR). Contudo, vários autores têm proposto diferentes sistemas reacionais para a produção de biodiesel *in situ* de microalgas.

A reação assistida em micro-ondas apresenta vantagens sobre o método tradicional como fornecer rápido aquecimento e consumindo um terço da energia de aquecimento convencional de duas etapas (LOONG; IDRIS, 2016). As micro-ondas criam fricção e colisões entre as moléculas e por isso aquecem rapidamente o meio reacional (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Porém, o rápido aquecimento tende a criar pontos quentes não fornecendo um aquecimento uniforme (LOONG; IDRIS, 2016).

Loong e Idris (2016) estudaram uma maneira de prevenir a ocorrência desses pontos quentes com um sistema de resfriamento ao mesmo tempo, mantendo assim o aquecimento de maneira homogênea. Segundo os autores, encontraram uma produção em biodiesel cinco vezes maior que o encontrado em banho de água. Em escala industrial, o processo de irradiação de micro-ondas talvez seja limitado pela disponibilidade dos materiais de construção e segurança do projeto (GO et al., 2016).

Já a reação assistida por ultrassom, fragmenta as células criando melhor interação entre o óleo e os reagentes. De acordo com vários autores, o ultrassom não tem efeitos positivos no rendimento de produtos quando usados no processo de TEIS já que muitas vezes apresenta o mesmo rendimento quando comparada o meio apenas agitado (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

Condições supercríticas e liquefação termoquímica requerem condições extremas que consomem muita energia, sendo necessária maior pesquisa sobre estes métodos (LOONG; IDRIS, 2016).

Independentemente do método assistido, o volume do reator deve ser suficiente para conter a carga reacional agitada para que a biomassa possa interagir eficazmente com o solvente. O sistema reacional, também, deve conter volume disponível para a expansão dos solventes durante o aquecimento (GO et al., 2016).

2.4.1.8 Temperatura

Trevisan et al (2013) aponta que o processo em temperaturas elevadas apresenta uma tendência em aumentar o rendimento da conversão devido a maior miscibilidade dos reagentes e solventes. Nos experimentos de Lemões (2011), Trevisan et al. (2013), Im; Kim e Lee, (2015), Kim; Im e Lee (2015) e Kim et al. (2015c) as temperaturas que apresentaram o maior rendimento em ésteres foram 90°C, 100°C, 95°C, 95°C e 100°C, respectivamente. Segundo o estudo cinético realizado por Nelson e Viamajala (2016), as maiores velocidades de reação ocorreram nas temperaturas de 90°C e 100°C, logo, se reduziu o tempo de reação para atingir altas conversões em menor tempo.

2.4.1.9 Tempo de reação

Procópio (2014) trabalhou com o tempo de reação de 60 minutos teve um baixo rendimento (67%) quando comparado a outros experimentos da literatura. O fato também é visto nos experimentos feitos por Ehimen, Sun e Carrington, (2010) nas quais as melhores conversões aconteceram entre 60 minutos e 240 minutos. Viêgas et al. (2015) e Lemões (2011) conseguiram atingir 98% de conversão utilizando os mesmos 240 minutos de reação. Já Im; Kim e Lee, (2015), Kim; Im e Lee (2015) e Kim et al. (2015c) atingiram bons rendimentos, respectivamente 91%, 98,8% e 99,7%, com tempos menores, respectivamente 90, 120 e 60 minutos. Segundo o estudo cinético realizado por Nelson e Viamajala (2016), a reação atinge o equilíbrio em cerca de 60 minutos para as temperaturas de 90°C e 100°C. No aumento de escala, tempo de reação menores ou maiores afetam a economia global de uma unidade de produção, sendo de grande importância o desenvolvimento de processos que atinja uma conversão alta em um menor tempo de reação.

2.4.1.10 Biomassa úmida

Como visto, Ehimen, Sun e Carrington (2010) relatam que em umidades superiores a 32% (em base seca) tem-se a inibição da síntese *in situ* dos ésteres em um processo com baixa razão álcool/biomassa e sem a utilização de co-solventes. Isso ocorre devido ao fato do catalisador ácido ser desativado pela água que compete pelo potencial de prótons na reação (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Água também pode diminuir o rendimento em ésteres, pois a esterificação dos ácidos graxos é uma reação de equilíbrio na qual se tem a água como produto, como visto na Figura 6. Logo, a umidade do meio deslocaria o equilíbrio para o sentido dos reagentes diminuindo a quantidade ésteres formados. Também, a água presente na biomassa pode servir como uma barreira que separa o óleo do solvente (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016), fato este que exigiria grandes volumes de solventes para que a água fosse suficientemente diluída. Industrialmente, a recuperação desses solventes utilizados em excesso produz águas residuais contaminadas com

solvente que exigem tratamento, encarecendo o processo (NELSON; VIAMAJALA, 2016).

No entanto, Cohen (1999) afirma que o processo de extração ocorre melhor quando pequena quantidade de água é adicionada junto ao solvente. Segundo o autor, solventes de polaridade mais elevada, tais como metanol e etanol, bem como solventes de baixa polaridade tais como hexano e clorofórmio, possuem baixa permeabilidade na parede celular da biomassa seca o que reduz a eficácia de extração. Cohen (1999) explica que a água adicionada junto ao solvente incha a estrutura celular da biomassa contendo polissacarídeos o que aumenta a permeabilidade dos solventes através da parede celular melhorando o processo de extração. Tal fato poderia ser utilizado a favor no processo de TEIS, pois, como atenta SKORUPSKAITE e colaboradores (2016), a aplicação do processo de TEIS em biomassa úmida pode fornecer uma melhor eficiência energética e econômica na produção de biodiesel, tornando-o competitivo no mercado. Assim, utilizar o fato de que porções de água incham a estrutura celular da microalga, como a própria umidade presente após a colheita da biomassa, e melhora da permeabilidade dos reagentes, é interessante para os estudos do processo de TEIS pois reduziriam o custo na produção de biodiesel de microalgas.

2.5 Subprodutos da produção de biodiesel de microalgas

Muito se tem falado sobre a quantidade excessiva de glicerol gerado como subproduto da produção de biodiesel. Anuar e Abdullah (2016) acreditam que este cenário poderia ser benéfico se um ponto de vista otimista fosse dado, bem como atrair novas oportunidades de pesquisa sob a sua aplicação, igualmente encorajaria o desenvolvimento do mercado de glicerol além de criar um novo quadro de aplicação para o glicerol para muitas indústrias. Anuar e Abdullah (2016) mostram a possibilidade do glicerol ser transformado em produtos de alto valor agregado através de vários processos, como o carbonato de glicerol que é utilizado como matéria prima de partida em muitas indústrias de produtos orgânicos.

Go et al. (2016) sugerem que a recuperação de pequenas quantidades, porém de alto valor agregado, de produtos fenólicos, flavonoides e esteróis

durante o processo de TEIS, pode contribuir para a redução do custo de produção.

A biomassa residual pode ser aproveitada de várias maneiras como por exemplo: i) misturada com ração para animais e peixes por ser rica em proteínas; ii) por ser rica em carboidratos, o resíduo de biomassa pode ser hidrolisado em glucose e fermentado em etanol; iii) transformada em bio-óleo pelo processo de pirólise; iv) ou ainda, ser utilizada como combustível em caldeiras à biomassa (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2014; PORPHY; FARID, 2012).

Como visto, a biomassa de microalgas tem um grande potencial para a produção de uma ampla gama de produtos, bem como utilização dos subprodutos advindos do processo de produção de biodiesel. Posada et al. (2016) sumariza os diferentes setores industriais para a utilização da biomassa de microalgas: alimentares, biocombustíveis, produtos químicos de base biológica, produtos orgânicos finos, bioplásticos, pigmentos, cosméticos e farmacêuticos, entre outros. Assim, o conceito de biorefinaria pode ser aplicado com eficácia aproveitando todas as frações da biomassa de microalgas.

2.6 Biorefinaria

Biorefinarias são instalações que integram processos de conversão de biomassa em vários produtos químicos e energia, além de otimizar o uso dos recursos e minimizar resíduos, maximizando assim os benefícios e rentabilidade (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016). Como visto, as microalgas tem potencial para diferentes setores industriais (POSADA et al., 2016) que podem ser integrados nas biorefinarias, viabilizando economicamente a produção dos biocombustíveis de algas (SUGANYA et al., 2016).

Vários estudos apontam para o alto custo de produção, balanço negativo de energia e CO₂ para produção de biocombustíveis de microalgas (POSADA et al., 2016). Logo, as biorefinarias, que utilizam de forma eficiente todas as frações de microalgas, podem resultar em melhores resultados econômicos e ambientais (POSADA et al., 2016). Brasil e colaboradores (2016) complementam que as biorefinarias tem o potencial de atender uma parte significativa da procura crescente de energia, combustíveis, produtos químicos e materiais em todo o mundo.

Segundo Posada et al. (2016), o sistema da biorefinaria baseada em microalgas é basicamente composto por 4 estágios de processamento: Cultivo de microalga, colheita, extração de lipídios e purificação e fracionamento dos produtos. Brownbridge et al. (2014), ainda, propõem a integração com sistemas de energia solar juntamente ao sistema de biorefinaria, como mostra a Figura 10, aumentando ainda mais a sustentabilidade da biorefinaria. Além disso, a utilização do CO₂ oriundo de combustão das indústrias no processo de cultivo, aumentaria a sua contribuição ambiental e econômica (POSADA et al., 2016).

Figura 10 Diagrama esquemático do processo de biorefinaria de microalgas

Fonte: Adaptado (BROWNBRIDGE et al., 2014)

Brasil e colaboradores (2016) discorreram sobre a possível integração de produção de microalgas com a indústria de combustíveis brasileira. Como descreve os autores, seria possível a integração com indústria de etanol de cana de açúcar: usar subprodutos como vinhaça e CO₂ para o cultivo de microalgas; integração com indústria de biodiesel: usar subprodutos como glicerol e efluentes da moagem da biomassa como suplemento no meio de cultivo, que também oferece possibilidades atraentes para integrar sistemas de cultivos de microalgas oleaginosas para plantas de biodiesel; integração com indústria de óleo e gás: a linha de produção destas indústrias geram grande fluxo de águas residuais altamente poluente por ter grande carga orgânica.

As microalgas também possuem quantidades significativas em carboidratos e proteínas, como pôde ser visto na Tabela 1, sendo que os carboidratos podem ser matéria prima para bioetanol obtido pela hidrólise da biomassa e posterior fermentação (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016a).

Assim, uma biorefinaria pode ser idealizada com possíveis aproveitamentos para a produção de biocombustíveis como bioetanol, biodiesel, bio-óleo, metano e gás de síntese (SUGANYA et al., 2016). O conceito de biorefinaria (apresentado na Figura 11) não leva em consideração outros potenciais produtos porém, como afirma Suganya et al. (2016), as microalgas também possuem potencial como recurso renovável de produtos para a saúde humana, nutrição animal e aquática, aplicações ambientais como mitigação de CO₂, tratamento de águas residuais, biofertilizantes, síntese de pigmentos e fármacos. No entanto, estas unidades poderiam facilmente ser alocadas próximos a biorefinarias.

O processo de biorefinaria apresentado na Figura 11 propõe utilizar a energia solar bem como a energia (térmica ou elétrica). Os cultivos seriam alimentados com CO₂ e efluentes com carga orgânica, como efluentes de laticínios e/ou usinas de etanol de cana de açúcar. Tanto o conteúdo em óleo quanto a biomassa residual seriam transformados em biocombustíveis. O óleo é esterificado em biodiesel e o glicerol utilizado por uma unidade de produtos orgânicos. A biomassa residual é hidrolisada e fermentada para a geração de bioetanol, podendo ser utilizado como reagente do processo de transesterificação. A biomassa residual ainda pode passar por pirólise (bio-óleo e metano) ou gaseificação (gás de síntese), ou ainda, queimadas em caldeiras de vapor para a cogeração de energia térmica e elétrica. Ademais, utilizar parte do biocombustível produzido ou resíduo sólido como abastecimento de energia no processo é um modo de torna-lo autossustentável.

Go et al. (2016) sugerem que a abordagem de biorefinaria integrada deve ser explorada em conjunto com os avanços do processo de TEIS, a fim de maximizar a utilização da matéria prima e melhorar a economia do processo. Salam e colaboradores (2016a) também afirmam que a TEIS da biomassa de microalgas para a produção de biodiesel pode ser uma boa base para uma biorefinaria baseada em microalgas.

Figura 11 Diagrama esquemático de biorefinaria de microalgas para a produção de biocombustíveis

Fonte: Próprio autor

2.7 Planejamento de Experimentos

Como explicam Kim et al. (2014), a abordagem experimental mais convencional é otimizar uma variável por vez em processo observando-se uma única resposta. Logo, um aumento gradual do número de fatores aumentaria o número de experimentos necessário na pesquisa. Além disso, em casos que existem mais de uma resposta, podem existir relações entre as múltiplas respostas, o que pode gerar conflitos na determinação da configuração dos parâmetros estudados.

De maneira geral, o planejamento de experimentos se trata de uma ferramenta estatística que possibilita a alteração proposital dos fatores (variáveis de entrada de um processo) e posteriormente analisa como o sistema respondeu às alterações sofridas e o efeito individual de cada fator sob o sistema. Como afirmam Cunico et al. (2008), com o planejamento fatorial é possível determinar quais fatores têm efeitos relevantes na resposta analisada e, também, como o

efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores, isso tudo com um número reduzido de experimentos. Cunico et al. (2008) ainda complementa, que sem o uso de planejamentos de experimentos, importantes interações entre fatores podem não são detectadas.

2.7.1 Metodologia de Taguchi

Uma ferramenta do planejamento de experimentos é o método de Taguchi, uma poderosa ferramenta que fornece uma abordagem simples, eficaz e sistemática para determinar os parâmetros ótimos de processo ou sistema (KIM et al., 2014). A metodologia busca aperfeiçoar um processo ou um produto através do diagnóstico e ajuste dos fatores controláveis que irão demonstrar a possibilidade de otimização do processo (RANJIT, 2010), de modo a reduzir o efeito das fontes de variação (variabilidade do processo) a um custo experimental mínimo (KIM et al., 2014).

A metodologia de Taguchi enfatiza a aproximação entre a engenharia e a qualidade, ao minimizar a variação do desempenho de um determinado produto ou processo, aumentando sua qualidade e consequentemente a satisfação dos clientes (RANJIT, 2010). Ao determinar o melhor ajuste dos níveis dos fatores, os produtos são fabricados em um processo robusto, ou seja, sem responder a fatores externos incontroláveis, tais como condições ambientais e variações dimensionais (CORREIA; CARDOZA, 2010).

Na matriz experimental, cada condição experimental é apresentada nas linhas da tabela e cada coluna refere-se a uma variável do processo com seu ajuste em um nível baixo ou alto. Na metodologia de Taguchi o nível baixo e alta são representados pelos números 1 e 2, respectivamente. A Tabela 3 apresenta uma matriz de L8 Taguchi.

Tabela 3 Matriz experimental L8 de Taguchi com sete fatores e dois níveis.

Experimento	Fatores						
	A	B	C	D	E	F	G
1	2	2	1	2	1	1	2
2	2	2	1	1	2	2	1
3	2	1	2	2	1	2	1
4	2	1	2	1	2	1	2
5	1	2	2	2	2	1	1
6	1	2	2	1	1	2	2
7	1	1	1	2	2	2	2
8	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: Próprio autor

As matrizes experimentais de Taguchi são designadas por L_i , onde i é o número de ensaios da matriz experimental, onde, para cada par de colunas, ocorrem todas as combinações de níveis dos fatores e ocorrem num número igual de vezes (SILVA et al., 2014).

Na metodologia de Taguchi, os gráficos lineares representam os arranjos experimentais. Os gráficos lineares possibilitam estudar interações entre fatores experimentais, bem como os efeitos de fatores individuais (efeitos principais) pois fornecem um esquema lógico para atribuir interações ao arranjo ortogonal sem que os efeitos sejam confundidos com as interações dos fatores estudados (SILVA et al., 2014). O gráfico linear da matriz L8 de Taguchi é apresentada na Figura 12.

Figura 12 Gráficos lineares de Taguchi para a matriz experimental L8 de Taguchi

Fonte: Ranjit (2010)

Os fatores devem ser distribuídos na matriz experimental com base no gráfico linear, onde os números representam as colunas da matriz experimental, os pontos indicados pelos números 1, 2, 4 e 7 representam os fatores a serem estudados para uma matriz L8, e as ligações entre os pontos representam a

interação dos dois fatores, as indicações 3, 5 e 7 representam as interações para uma matriz L8. Assim, com a correta colocação dos fatores na matriz é possível a visualização do efeito das interações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Metodologia do Trabalho

O trabalho seguiu cinco etapas (Figura 13):

1. Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* em fotobiorreatores de colunas de bolhas em meio Guillard f/2 sem sílica (GUILLARD, 1975);
2. Separação da biomassa do meio de cultivo por floculação e filtração a vácuo, e posterior armazenagem à frio (-20°C);
3. Secagem da biomassa em estufa de secagem;
4. Extração e transesterificação (processo em duas etapas) dos lipídios de parte da biomassa cultivada, para determinação do percentual de lipídios da amostra da biomassa e conversão em ésteres etílicos;
5. Execução dos experimentos conforme a matriz experimental para a determinação das melhores condições do processo de TEIS com biomassa seca e úmida.

Figura 13 Etapas do trabalho

Fonte: Próprio autor

3.2 Cultivo das Microalgas

Os cultivos das cepas da microalga *Chlorella minutíssima*, gentilmente doadas pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da USP, foram conduzidos em meio Guillard f/2 sem sílica (Tabela 4) para a produção de biomassa.

Tabela 4 Reagentes do meio Guillard f/2 sem sílica

Reagentes	Concentração
Sal marinho	33,3 g/l
NaNO ₃	75g/l
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5g/l
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15g/l
Na ₂ EDTA	4,3g/l
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22,2mg/l
MnCl ₂ . 4H ₂ O	180mg/l
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	6,3mg/l
CoCl ₂ . 6H ₂ O	10mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8mg/l
Tiamina(B1)	100mg/l
Cianocobalamina (B12)	0,5mg/l
Biotina (B7)	0,5mg/l

Fonte: Adaptado de Amaral (2014); Guillard (1975)

Os cultivos foram efetuados em fotobiorreatores de colunas de bolhas com volume útil de 40 litros cada (Figura 14), construído em acrílico, com aeração de 1,33 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) e iluminados por lâmpadas fluorescentes de 40W, 62 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de iluminação, 24 horas por dia durante sete dias. A biomassa foi então floculada e separada por filtração a vácuo e posteriormente armazenada a frio (aproximadamente -20°C).

Figura 14 Fotobiorreatores utilizados para cultivoda biomassa

Fonte: Próprio Autor

Na Figura 15 são apresentados os cultivos realizados nos fotobiorreatores de colunas de bolhas. A Figura 15 (a) ilustra o início do cultivo, após a inoculação do reator. Na Figura 15 (b) é ilustrado o reator no 8º dia de cultivo no qual foi realizada a colheita da biomassa.

Figura 15 Fotobiorreatores de coluna (a) após inoculação do meio de cultivo e (b) no 8º dia de cultivo.

(a)

(b)

Fonte: Próprio Autor

A colheita da biomassa foi realizada com o bombeamento do cultivo em um tanque de fundo cônico como apresentado na Figura 16. A Figura 16 (a) apresenta o material após o bombeamento. Em seguida foi adicionado cerca de 3 mL/L de sulfato de alumínio para a floculação das células suspensas. O meio foi fortemente agitado. A Figura 16 (b) apresenta o material sedimentado ao fundo do tanque, cerca de uma hora após a adição do sulfato de alumínio. A fase concentrada em células foi recolhida e filtrada a vácuo. A biomassa foi filtrada e armazenada em congelador e apresentou cerca de 85% de umidade. Em média, os cultivos produziram entre 0,21 a 0,31 gramas de biomassa seca por litro de cultivo.

Figura 16 Tanque de Floculação: (a) cultivo sem o sulfato de alumínio e (b) cultivo após 60 minutos da adição do sulfato de alumínio

(a)

(b)

Fonte: Próprio Autor

3.3 Processo de transesterificação *in situ*

Cada condição de síntese conforme a matriz experimental foi realizada em balão de vidro de fundo redondo conectado a um condensador de refluxo, em banho termostático conforme ilustrado na Figura 17. A Figura 18 apresenta o aparato experimental real utilizado. A biomassa foi descongelada em temperatura ambiente e, posteriormente, disposta em estufa para secagem a 60°C até não haver mais variação da massa. Posteriormente, a umidade foi confirmada em balança de umidade (ID 50, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.).

A reação e as etapas do processo de separação dos produtos são apresentadas na Figura 19. Ao término da reação realizada a 95°C em 90 minutos (Figura 19 a), o meio reacional foi resfriado até temperatura ambiente.

A mistura reacional foi filtrada em funil com papel de filtro (Figura 19 b) e o resíduo foi lavado duas vezes com álcool etílico P.A. (Figura 19 c) para a retirada completa dos produtos reacionais. À solução filtrada, foi adicionada uma

solução de hexano e água na proporção de 1:1 (v:v) (Figura 19 d) com o propósito de haver a separação dos compostos hidrofóbicos e hidrofílicos para as respectivas fases.

Figura 17 Representação experimental para a reação de TEIS

Fonte: Próprio autor

Figura 18 Aparato real utilizado no processo de TEIS

Fonte: Próprio autor

A mistura foi agitada e colocada em funil de separação e posta em repouso por 20 minutos para a separação das fases. Após repouso, ocorre a formação de um sistema bifásico. Na fase orgânica, fase superior menos densa, encontra-se o biodiesel. E na fase inferior, fase aquosa, mais densa, o excesso de álcool, glicerol e catalisador ácido.

Após a primeira separação, a fase orgânica foi lavada duas vezes com água destilada para retirar o excesso de ácido presente na amostra (Figura 19 e). A mistura também foi colocada em funil de separação aguardando o tempo de 20 minutos para a separação completa das fases. Para remover resíduos de água presentes na fase orgânica, cristais de sulfato de sódio anidro são adicionados ao meio, seguido pela filtração.

Por fim, a fase orgânica é aquecida para a evaporação do solvente orgânico (Figura 19 f) que, para tanto, foi colocado em estufa a 60°C durante 24 horas para a evaporação do hexano. Após esse período, a amostra de biodiesel foi pesada para determinação do rendimento mássico de biodiesel (Figura 19 g). Cada ensaio foi realizado em triplicata seguindo todas as etapas descritas anteriormente.

Figura 19 Processo de separação dos produtos

Fonte: Adaptado de Donald L. Pavia et al. (2009) e Ehimen; Sun; Carrington (2010)

3.4 Processo de duas etapas

3.4.1 Extração de Lipídios

A biomassa congelada foi disposta em estufa de secagem a 60°C até atingir peso constante e, posteriormente, a determinação da umidade em balança de umidade (ID 50, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.) a qual indicou 3,77% de umidade em base seca. A extração dos óleos foi realizada utilizando o método Bligh e Dyer (1959) modificado (ZORN et al., 2016) com a utilização do banho ultrassônico e solventes. A utilização do ultrassom maximiza a extração dos óleos contidos nas células, pois, com a ruptura celular pelo ultrassom, ocorre o aumento da área de contato entre o lipídio e os solventes, portanto, resultando em maior solubilidade do óleo no solvente. Assim, a extração via solventes com a utilização do ultrassom será mais eficiente e melhora a exatidão da contabilização dos lipídios disponíveis na biomassa (WANG et al., 2012).

Inicialmente, 1 grama da biomassa seca foi colocado em um erlenmeyer de 125 mL e adicionado a quantidade correspondente de água destilada a fim de atingir o percentual de umidade de 64% conforme a metodologia referenciada (ZORN et al., 2016). O período de hidratação foi de 30 minutos. A extração com solvente foi realizada utilizando a proporção clorofórmio:metanol:água de 5,7:3:1 (v/v/v) em um volume total de 33 mL. O processo foi dividido em 3 etapas que consistiram em: 1) adicionar as medidas de metanol e metade da medida de clorofórmio na amostra hidratada, seguido de 25 min em banho de ultrassom; 2) adicionar outra metade da medida de clorofórmio, seguido de mais 25 minutos em banho de ultrassom; 3) adicionar a medida de água destilada e agitar o erlenmeyer. Após a conclusão destas etapas, foi realizada filtração da suspensão contida no Erlenmeyer em papel de filtro e o filtrado colocado em funil de separação para a separação de fases. Após 30 minutos, a fase inferior, contendo a fase orgânica com os lipídios extraídos, foi separada, coletada e aquecida em estufa a 60°C para a evaporação do clorofórmio até atingir peso constante. A amostra contendo os lipídios foi então pesada para a determinação do percentual em lipídio da biomassa conforme a Equação (1).

$$\text{Percentual de Lipídios} = C = \frac{L}{M} * 100 \quad (1)$$

Em que C é o percentual de lipídios extraíveis na biomassa (% mássico em base seca); L é massa de lipídios extraídos, M é a massa da biomassa seca.

3.4.2 Reação de Transesterificação

Após a extração, os lipídios foram convertidos em ésteres etílicos utilizando banho de ultrassom como meio de agitação, no qual ocorreu em meio reacional contendo etanol na razão molar etanol:lipídio de 20:1 na presença de 10% (m/m) de H₂SO₄ como catalisador a temperatura de 80°C por 5 horas. A etapa de separação do produto foi a mesma utilizada no subitem 3.3.

3.5 Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) é utilizada para contabilizar o número de hidrogênios presentes na amostra com o composto, confirmando a conversão dos lipídios em biodiesel. Para este trabalho foi utilizado o espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz. As amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl₃).

Segundo Garcia (2006), a indicação da presença de éster metílico, reação feita com Metanol, em um espectro de RMN¹H é um singlete próximo a 3,64 ppm (Figura 20a) característico de metoxila de éster (CH₃-O). Já presença do éster etílico, reação feita com Etanol, em um espectro de RMN¹H é confirmada pelo quarteto entre 4,05 e 4,35 ppm (Figura 20.b) característico da etoxila de éster (C₂H₅-O).

Figura 20 Hidrogênios utilizados na quantificação da transesterificação dos lipídios (a) éster metílico e (b) éster etílico

Fonte: Garcia (2006)

Assim, a análise em RMN^1H é uma maneira simples de analisar o processo de TEIS da biomassa de microalgas.

3.6 Quantificação de Ésteres Etílicos Brutos

3.6.1 Rendimento mássico (%m/m)

O percentual de lipídios contido na biomassa original é considerado como controle para o rendimento mássico na TEIS. Como explica ZHANG et al. (2016), a partir da quantidade de lipídios extraíveis por solventes pode-se calcular a eficiência do processo de TEIS ou rendimento mássico bruto em ésteres etílicos, como ilustra a Figura 21.

Figura 21 Quantidade de óleo extraído via solventes utilizada como referencial para cálculo do rendimento mássico do processo de TEIS.

Fonte: Próprio autor

Assim, caso o processo de TEIS extraia e converta maior quantidade de lipídios que o processo de extração com solvente, os percentuais podem ultrapassar o cem por cento indicando maior eficiência pelo processo de TEIS.

O rendimento mássico foi calculado pela Equação 2 apresentada abaixo.

$$\% \frac{m}{m} = \frac{B}{C \cdot M} \cdot 100 \quad (2)$$

Em que B é massa bruta de ésteres obtida pelo processo; C é o percentual de lipídios contido na biomassa; M é a massa da biomassa seca colocada no reator.

Desta forma, a Equação 2 relaciona o quanto o processo de TEIS consegue recuperar os lipídios comparado a quantidade de lipídios extraídos no processo em duas etapas, extração seguido da conversão em ésteres.

3.6.2 Conversão em Éster Etílico (% EE)

O rendimento em ésteres etílicos, podem ser estimados pela análise dos espectros de RMN¹H ao se comparar as áreas dos picos relativos aos ésteres de ácido graxos com as áreas dos picos relativos ao lipídio.

A proporção de éster etílico e lipídio não convertido durante a reação de transesterificação pode ser determinada relacionando a área do quarto componente do quarteto em 4,09 ppm e a área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm (Figura 22).

Segundo Garcia (2006), a presença de triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, que não foram convertidos durante a reação de transesterificação, geram picos de ressonância observáveis, também, entre 4,35 e 4,05 ppm, sendo apenas o pico de ressonância próximo a 4,09 ppm (componente 4 da Figura 22) que não apresenta a sobreposição de nenhum outro sinal dos monos, di ou triglicerídeos.

Logo, a conversão em ésteres etílico pode ser calculada pela seguinte equação (GARCIA, 2006):

$$\%EE = \frac{AC4.8}{AT} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde A_{C4} área do componente C4 (δ na faixa de 4,08 a 4,09 ppm), referente ao éster etílico, e A_T área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm, referente tanto aos ésteres etílicos quanto aos monos, di ou triglicerídeos não convertidos em ésteres etílicos.

Figura 22 Área do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio etoxílicos dos ésteres etílicos em espectro de RMN¹H

Fonte: Garcia (2006)

3.7 Planejamento Experimental

Este trabalho propôs dois estudos distintos. Inicialmente, estudou-se o processo de TEIS com a utilização da biomassa seca a fim de se explorar as condições na quais se obtém bons rendimentos em massa e conversão de lipídios em ésteres etílicos, visto que na literatura as quantidades de reagentes utilizadas não são padronizadas. Posteriormente, em posse das melhores condições do processo de TEIS para a biomassa seca, investigou-se o processo de TEIS com a utilização da biomassa úmida (84%, umidade presente após a etapa de filtração) juntamente com a inclusão do tipo de ácido utilizado na reação (H_2SO_4 e HCl).

Para ambos estudos, foram fixados a temperatura de 95°C e tempo de reação de 90 minutos. Com base na literatura, decidiu-se por fixar a temperatura em 95°C, por se tratar da temperatura próxima a ebulição da água e de maior facilidade de controle experimental. E como forma de determinar a melhor condição de trabalho em tempos menores, com base na literatura, decidiu-se fixar o tempo em 90 minutos de reação, tempo relativamente curto, porém suficiente para que a extração e reação ocorram de maneira satisfatória.

3.7.1 Processo *In Situ* a partir da biomassa seca

3.7.1.1 Parâmetros de Reação e Níveis para TEIS

Com base em pesquisas bibliográficas foram utilizados para o estudo exploratório da TEIS a partir da biomassa seca os seguintes parâmetros: razão etanol/biomassa (mL/g), razão ácido sulfúrico/biomassa (mL/g); razão clorofórmio/biomassa (mL/g).

3.7.1.1.1 Razão etanol/biomassa (mL/g)

Como é apontado por Lemões (2011), o álcool, tanto metanol quanto o etanol, ambos agentes acilantes e solventes do meio reacional, é utilizado em excesso para deslocar o equilíbrio na direção de formação de produtos em razão da reação de transesterificação ser reversível. No entanto, Ehimen et al (2010) trabalharam com 4 mL de metanol por grama de biomassa para converter 92% dos lipídios, e Trevisan et al. (2013) trabalharam com 125 mL de etanol por grama de biomassa. Suh et al. (2015), por sua vez, alcançaram a conversão completa dos lipídios utilizando 10 mL de etanol por grama de biomassa. Como a diferença no volume de álcool na literatura é significativamente grande (125 mL/g e 10 mL/g), decidiu-se que seria pertinente explorar o volume álcool utilizado. Para tanto, as razões etanol/biomassa foram divididas em 100, 50, 25 e 10 mL/grama de biomassa

3.7.1.1.2 Razão Ácido Sulfúrico/biomassa (mL/g)

Com base na literatura, as quantidades de ácido por grama de biomassa variam de autor para autor, majoritariamente entre 0,1 mL/g a 1 mL/g. Alguns autores propuseram maiores quantidades de ácido como 5 mL/g, mas sabe-se que altas concentrações de ácido em altas temperaturas polimerizam os ácidos graxos insaturados (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). As razões exploradas nesta primeira etapa de estudo foram as razões ácido sulfúrico/biomassa de 0,1 mL/g a 1 mL/g, faixa encontrada nos trabalhos publicados até então.

3.7.1.1.3 Razão clorofórmio/biomassa (mL/g)

Alguns estudos mostram que o uso de pequenas quantidades de solvente no meio reacional, como clorofórmio ou hexano, aumenta o rendimento da reação. A adição de co-solventes ajuda na ruptura e extração dos lipídios, aumentando o contato entre o óleo e os agentes de esterificação (transferência de massa: óleo para álcool), além de diminuir a quantidade de álcool inserida no reator (SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016).

Com base na literatura, as razões estudadas neste trabalho foram as razões clorofórmio/biomassa de 5 mL/g e 15 mL/g, faixa encontrada nos trabalhos publicados até então. Níveis mais altos de co-solvente, como o clorofórmio não foram considerados pois, como alerta Go et al. (2016), embora o uso de co-solventes seja uma maneira efetiva de melhorar a solubilidade dos reagentes e atingir melhores resultados em extrações, exige-se cautela para que o meio não resulte em um sistema diluído.

3.7.1.2 Matriz L4 de Taguchi para o Estudo Exploratório

Com o propósito de averiguar a existência de um consumo excessivo de reagentes, devido a diferença significativa (10 mL/g e 125 mL/g) no volume do álcool utilizado pelos autores na literatura, as quantidades de álcool foram divididas em 100, 50, 25 e 10 mL/grama de biomassa e organizadas em duas matrizes L4 de Taguchi com 3 fatores, como ilustra a Figura 23.

Figura 23 Representação ilustrativa do estudo exploratório para investigação da razão etanol/biomassa

Fonte: Próprio Autor

Com a temperatura fixada em 95°C e tempo de reação de 90 minutos, foi utilizado um planejamento fatorial em triplicata através de uma matriz ortogonal de Taguchi L4, conforme a Tabela 7. A Tabela 5 apresenta os níveis dos fatores para a Matriz experimental L4 A e a Tabela 6 os níveis dos fatores para a Matriz experimental L4 B, subdividindo, assim, os níveis de interesse da razão etanol/biomassa.

Tabela 5 Fatores e níveis do processo *in situ* para as razões etanol/biomassa 50mL/g e 100mL/g (Matriz L4 A)

Fator Codificado	Fator	1 (Nível Baixo)	2 (Nível Alto)
A	Razão etanol/biomassa (mL/g biomassa)	50	100
B	Razão clorofórmio/biomassa (mL/g biomassa)	5	15
C	Razão ácido sulfúrico/biomassa (mL/g biomassa)	0,1	1

Fonte: Próprio Autor

Tabela 6 Fatores e níveis do processo *in situ* para as razões etanol/biomassa 10mL/g e 25mL/g ((Matriz L4 B)

Fator Codificado	Fator	1 (Nível Baixo)	2 (Nível Alto)
A	Razão etanol/biomassa (mL/g biomassa)	10	25
B	Razão clorofórmio/biomassa (mL/g biomassa)	5	15
C	Razão ácido sulfúrico/biomassa (mL/g biomassa)	0,1	1

Fonte: Próprio Autor

Tabela 7 Matriz experimental L4 de Taguchi com três fatores e dois níveis.

Experimento	Fatores		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Fonte: Próprio Autor

As variáveis resposta analisadas foram: o rendimento mássico (%m/m), determinado pela equação (1) e a conversão em éster etílico (%EE), determinado pela equação (2) com base nas informações obtidas pelo espectro de RMN¹H.

3.7.2 Processo *In Situ* a partir da biomassa Úmida

Subsequentemente, com base no estudo exploratório utilizando-se da biomassa seca, foram feitos ajustes das variáveis e inclusão de parâmetro para a realização do processo *in situ* utilizando-se a biomassa úmida.

3.7.2.1 Parâmetros de Reação e Níveis para TEIS úmida

3.7.2.1.1 Razão etanol/biomassa (mL/g)

Com base nos resultados exploratórios (item 4.2), foi determinado que tanto um grande excesso quanto uma baixa quantidade de etanol no processo *in situ* não apresentaram bons rendimentos, tanto em massa quanto em conversão

do óleo. Logo, as razões de 25 mL/g e 50 mL/g foram as que apresentaram os melhores resultados utilizando a biomassa seca, indicando uma condição no qual a extração reativa seja ideal. Assim, foi de interesse utilizar estes dois níveis e averiguar seu efeito na utilização da biomassa úmida.

3.7.2.1.2 Proporção volumétrica clorofórmio:etanol (v:v)

Os resultados obtidos no estudo exploratório indicaram que os trabalhos com a quantidade de clorofórmio são melhor investigados aplicando-se a quantidade de clorofórmio proporcional à quantidade de etanol. Assim, a proporção volumétrica clorofórmio:etanol é mais adequada.

Foram calculadas as proporções clorofórmio:etanol utilizadas nas duas melhores condições experimentais encontradas no estudo com biomassa seca e utilizadas para este estudo com a utilização da biomassa úmida. Logo, as proporções calculadas 1:10 (v:v) e 1:5 (v:v) foram utilizadas com nível baixo e alto, respectivamente, para este estudo.

3.7.2.1.3 Concentração do Catalisador ácido (mol/L)

Com base nos resultados do estudo exploratório, foi possível determinar que a utilização da quantidade de ácido expressa em termos de concentração é mais adequada. Por conseguinte, as concentrações de ácido sulfúrico que melhor catalisam a reação de maneira *in situ* no estudo com a utilização da biomassa seca foram as concentrações de 0,3 mol/L e 0,6 mol/L, respectivamente, nível baixo e alto para estudo com a utilização da biomassa úmida.

3.7.2.1.4 Catalisador ácido

Como anteriormente apresentado, poucos são os estudos com a utilização de ácido clorídrico como catalisador, sendo majoritariamente o H₂SO₄ o catalisador utilizado. Logo, foi de interesse avaliar estes dois catalisadores ácidos para o processo de TEIS a partir da biomassa úmida da microalga *Chlorella minutissima*. O parâmetro catalisador ácido na matriz experimental utilizou o HCl

como nível baixo e o H_2SO_4 como nível alto, respeitando as mesmas quantidades molares.

3.7.2.2 Matriz L8 de Taguchi para o processo *in situ* a partir biomassa úmida

Com a temperatura fixada em 95°C , tempo de reação de 90 minutos e umidade da biomassa em 84%, foi utilizado um planejamento fatorial em duplicata através de uma matriz ortogonal de Taguchi L8 com 4 fatores e dois níveis, conforme a Tabela 9. A Tabela 8 apresenta os níveis dos fatores para a matriz experimental L8.

Tabela 8 - Fatores e níveis da do processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

Fator Codificado	Fator	1 (Nível Baixo)	2 (Nível Alto)
A	Catalisador ácido	HCl	H_2SO_4
B	Concentração do catalisador ácido (mol/L)	0,3	0,6
C	Interação AB	-	-
D	Razão etanol/biomassa (mL/g)	25	50
E	Interação AD	-	-
F	Interação AG	-	-
G	Proporção clorofórmio:etanol (v:v)	1:10	1:5

Fonte: Próprio Autor

Tabela 9 - Matriz experimental L8 de Taguchi com sete fatores e dois níveis.

Experimento	Fatores						
	A	B	C	D	E	F	G
1	2	2	1	2	1	1	2
2	2	2	1	1	2	2	1
3	2	1	2	2	1	2	1
4	2	1	2	1	2	1	2
5	1	2	2	2	2	1	1
6	1	2	2	1	1	2	2
7	1	1	1	2	2	2	2
8	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: Próprio Autor

Os fatores foram distribuídos com base no gráfico linear de Taguchi para a matriz L8 apresentado na Figura 24. Os números representam as colunas da

matriz experimental, os pontos (1, 2, 4 e 7) representam os fatores a serem estudados e os traços ligando os pontos representam a interação dos dois fatores (3, 5 e 6). Assim, com a correta colocação dos fatores na matriz foi possível visualizar o efeito das interações dos dois catalisadores utilizados com a sua respectiva concentração, com os volumes de etanol utilizados e, também, com a proporção clorofórmio:etanol.

Figura 24 Gráfico linear de Taguchi para a matriz experimental L8

Fonte: Ranjit (2010)

As variáveis resposta analisadas foram: rendimento mássico (%m/m), determinado pela equação (1); conversão em ésteres etílicos (%EE), determinado pela equação (2) com base nas informações obtidas pelo espectro de RMN¹H; e produção de ésteres $\text{kg}_{\text{ésteres}} \cdot \text{L}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo em duas etapas (Extração – Transesterificação)

4.1.1 Percentual de lipídios

As extrações foram feitas em triplicata, empregando a metodologia apresentada no Item 3.4.1. As amostras contendo os lipídios extraídos foram pesadas e o percentual de cada amostra foi calculado conforme a Equação (1). O percentual médio calculado foi de $20,29\% \pm 0,48$ em lipídios. Pela literatura, este é um resultado satisfatório em teor de lipídios, visto que, para a microalga *Chlorella minutissima*, seu percentual pode variar de 9% a 31% (CAMPOS; BARBARINO; LOURENÇO, 2010; ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000) conforme o meio de cultivo utilizado. Em meios de cultivos otimizados, os percentuais em lipídios da microalga *Chlorella minutissima* atingiram cerca de 37.1% no cultivo suplementado com CO₂ realizado por Loures (2016) e 57% no cultivo com baixa concentração de nitrato realizado por Illman e colaboradores (2000).

4.1.2 Conversão em ésteres etílicos

As reações foram feitas em duplicata conforme metodologia apresentada no item 3.4.2. As amostras antes e após a reação de transesterificação do óleo extraído da microalga *Chlorella minutissima* foram analisadas por RMN¹H. Os espectros de RMN¹H antes e após a reação de transesterificação são apresentados na Figura 25.

Figura 25 Espectro de RMN¹H para (a) amostra de óleo extraído e (b) amostra após transesterificação

Fonte: Próprio Autor

Nota-se, no espectro de RMN¹H para o óleo extraído (Figura 25 a), a presença da dupla de dupletos na faixa de 4,35 e 4,25 ppm que são sinais de ressonância característicos dos triglicerídeos (principais constituintes dos lipídios). No espectro para a amostra do óleo após a reação de transesterificação (Figura 25 b), nota-se a conversão do lipídio em ésteres etílicos pela presença do

quarteto na faixa de 4,15 e 4,08, sinal de ressonância característico da etoxila de éster (C_2H_5-O).

Como visto, a presença de mono, di e triglicerídeos indicam que a reação de transesterificação foi incompleta. Tais compostos geram sinais de ressonância entre 4,35 a 4,11 ppm (GARCIA, 2006), no entanto, estes sinais praticamente não são observáveis no espectro de RMN¹H para a amostra após a reação de transesterificação (Figura 25 b), indicando uma alta conversão em ésteres etílicos.

O percentual de conversão em ésteres etílicos após a reação de transesterificação, calculado conforme apresentado no item 3.6.2, foi de 91,60% $\pm$ 2,83 em ésteres etílicos. Amaral (2014) e Loures (2016), ambos sob condições reacionais semelhantes (razão molar etanol:lipídio de 30:1, 10% (m/m) de H_2SO_4 a 60°C) obtiveram conversões menores que a encontrada neste trabalho. Amaral (2014) obteve 78,4% de conversão em 4 horas de reação e Loures (2016) reporta atingir 80% de conversão em 6 horas de reação. A maior conversão conquistada neste trabalho se deve a maior temperatura de reação (80°C).

4.2 Processo *In Situ* a partir da biomassa Seca (Estudo Exploratório)

Os experimentos foram realizados em triplicatas, empregando a metodologia de Taguchi. Foram investigados simultaneamente os efeitos de três variáveis envolvidas no processo de síntese *in situ* de ésteres etílicos de ácido graxos: razão etanol/biomassa (mL/g), razão clorofórmio/biomassa (mL/g) e razão ácido sulfúrico/biomassa (mL/g). A matriz experimental e os resultados obtidos em triplicata são apresentados nas Tabela 10 e Tabela 11. A Tabela 10 apresenta os resultados para as razões etanol/biomassa 100 mL/g e 50 mL/g (Matriz L4 A). A Tabela 11 apresenta os resultados para as razões etanol/biomassa 25 mL/g e 10 mL/g (Matriz L4 B). As Tabela 10 e Tabela 11 apresentam as respostas média do rendimento mássico (% m/m) e conversão etílica (%EE) referentes a cada condição experimental.

Tabela 10 Matriz experimental e resultados obtidos no processo *in situ* para as razões etanol/biomassa 100 mL/g e 50 mL/g (Matriz L4 A)

Experimento	Fator			Variável Resposta	
				% m/m	%EE
	A	B	C		
1	1	1	1	83,90 ± 2,76	80,00
2	1	2	2	88,70 ± 3,82	72,00
3	2	1	2	77,84 ± 2,27	64,00
4	2	2	1	65,84 ± 3,97	48,00

A – Razão etanol/biomassa; B – Razão clorofórmio/biomassa; C – Razão ácido sulfúrico/biomassa.

Fonte: Próprio Autor

Tabela 11 Matriz experimental e resultados obtidos no processo *in situ* para as razões etanol/biomassa 25 mL/g e 10 mL/g (Matriz L4 B)

Experimento	Fator			Variável Resposta	
				% m/m	%EE
	A	B	C		
1	1	1	1	74,38 ± 3,33	48,00
2	1	2	2	72,75 ± 2,30	80,00
3	2	1	2	86,16 ± 4,16	96,00
4	2	2	1	87,18 ± 2,58	56,00

A – Razão etanol/biomassa; B – Razão clorofórmio/biomassa; C – Razão ácido sulfúrico/biomassa.

Fonte: Próprio Autor

Os percentuais em ésteres etílicos obtidos no processo *in situ* a partir da biomassa seca foram estimados pelas áreas dos picos de interesse dos espectros de RMN¹H com o auxílio do programa MestReC. Os espectros de RMN¹H para cada ensaio realizado são apresentados nas Figuras de 39 a 46 do Anexo A. Com base nos espectros obtidos, todas as amostras do processo de TEIS da biomassa de microalga apresentaram o quarteto entre 4,05 e 4,35 ppm característico da etoxila de éster (C₂H₅-O).

Os espectros de RMN¹H apresentados nas Figura 26 e Figura 27 correspondem as análises das amostras do experimento 4 da matriz L4A e do experimento 3 da matriz L4B, respectivamente.

Figura 26 Espectro de RMN¹H - Experimento 4 Matriz L4 A

Fonte: Próprio Autor

Figura 27 Espectro de RMN¹H - Experimento 3 Matriz L4 B

Fonte: Próprio Autor

Nota-se, no espectro de RMN¹H do experimento 4 da matriz L4 A (Figura 26), a presença de sinais de ressonância na faixa de 4,35 e 4,25 ppm e também a sobreposição de sinais em torno do sinal em 4,15 ppm que indicam uma reação de transesterificação incompleta, visto que, esses sinais de ressonância são oriundos dos mono, di ou triglicerídeos não convertidos presentes na amostra. Consequentemente, este ensaio exibe uma baixa conversão em ésteres etílicos, especificamente, 48% de conversão, menor percentual atingido neste estudo com a biomassa seca (Tabela 10). No entanto, o experimento 3 da matriz L4 B (Figura 27) exibe uma alta conversão em ésteres etílicos, em razão da formação do quarteto bastante nítido e intenso, praticamente sem a presença de outros sinais resultantes de mono, di ou triglicerídeos. Em específico, 96% de conversão (Tabela 11), sendo o ensaio que atingiu a maior conversão neste estudo com a biomassa seca.

Inicialmente, de maneira geral, pela Tabela 10 e Tabela 11, pode-se notar que os rendimentos mássico de cada condição experimental obtidos na TEIS apresentaram valores variando de 65% a cerca de 88%. Sendo que para a matriz L4 A os melhores resultados ocorreram quando o nível baixo da razão etanol/biomassa foi utilizado, ou seja, 50mL/g (experimentos 1 e 2). Enquanto que, para a matriz L4 B, os melhores resultados foram encontrados quando aplicado o nível mais alto da razão etanol/biomassa, ou seja, 25mL/g (experimentos 3 e 4). Indicando que os melhores resultados mássicos do processo *in situ* estão entre as razões etanol/biomassa 25mL/g a 50 mL/g.

Os melhores resultados em conversão em ésteres etílicos, para a matriz L4 A, também ocorreram em nível baixo da razão etanol/biomassa, ou seja, 50mL/g (experimentos 1 e 2). Enquanto que, para a matriz L4 B, os melhores resultados em conversão em ésteres etílicos correspondem ao nível alto da razão ácido sulfúrico/biomassa, ou seja, 1mL/g (experimentos 2 e 3). Isto indica uma possível melhora da catálise da reação ao utilizar uma maior concentração de ácido sulfúrico resultando em maiores percentuais de conversão.

Uma análise mais detalhada foi realizada com ferramentas estatísticas no subitem seguinte (4.2.1).

4.2.1 Análise Estatística

Todos dos gráficos para a visualização dos efeitos das variáveis manipuladas sobre as variáveis respostas, e a tabela de análise de variância foram gerados pelo software Statistica 13.

4.2.1.1 Efeitos dos fatores para rendimento mássico

4.2.1.1.1 Rendimento mássico para matriz experimental L4 A

Para a matriz L4A, a análise dos gráficos de efeitos para médias em rendimento mássico, apresentada na Figura 28, observa-se que a razão etanol/biomassa (Fator A) é o fator de maior impacto sob o processo *in situ* visto a amplitude da reta formada entre o ponto máximo e as médias das médias, ou seja, com maior a amplitude da reta maior a influência do fator sobre a variável resposta. Seguido pela razão ácido sulfúrico/biomassa (Fator C) mostrou grande amplitude, portanto, significativo para o processo. Estes fatos são confirmados pela tabela ANOVA (Tabela 12) onde os fatores A e C foram significativos no nível de 95% de confiança e B a 90% de confiança.

Assim, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta %m/m são os fatores A e B no nível baixo (50mL/g de etanol e 5 mL/g de clorofórmio, respectivamente). Somente o fator C é sugerido no nível alto (1mL de H₂SO₄ por grama de biomassa). Em variável codificada, o ajuste sugerido fica 1,1,2. No entanto, este é um ajuste que não existe na matriz L4 de Taguchi, logo, este ajuste foi testado para confirmar o melhor ajuste encontrado.

Figura 28 Gráficos de efeitos principais para as médias de %m/m para as razões etanol/biomassa 100mL/g e 50mL/g (Matriz L4 A)

Fonte: Próprio Autor

Tabela 12 Análise de Variância para as Médias de %m/m da Matriz L4 A

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
A	1	0,063	0,063	58,311	0,000
B	1	0,004	0,004	3,605	0,094
C	1	0,021	0,021	19,689	0,002
Erro	8	0,009	0,001		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio Autor

Seguindo as mesmas condições experimentais; 95°C e 90 minutos de reação, o teste confirmatório foi executado em triplica com 50mL de etanol, 5mL de clorofórmio e 1mL de ácido sulfúrico, conforme sugerido pelos gráficos de efeitos da metodologia de Taguchi. O ajuste resultou em média 103,93% $\pm$ 3,76, um percentual de biodiesel *in situ* maior que os encontrados na matriz L4 A,

confirmando que o ajuste sugerido pelo método de Taguchi é de fato o melhor ajuste para os níveis escolhidos.

Como descrito no capítulo 3.6.1, o percentual de rendimento mássico em ésteres brutos é calculado com base na máxima quantidade de lipídios que pode ser extraída via solventes, sendo este um parâmetro de controle para o processo *in situ* (Figura 21). Assim, obter valores acima de 100%, como neste caso, significa o método de TEIS está sendo mais efetivo na extração dos lipídios. Ou ainda, como explicam Wahlen, Willis e Seefeldt (2011), os rendimentos mássicos mais elevados em ésteres brutos pode ser atribuído pela melhor extração dos lipídios e ácidos graxos das células, bem como, pela conversão dos fosfolipídios da membrana celular mais fragmentada, devido ao meio reacional acidificado, que são mais facilmente extraídos durante o processo *in situ*, aumentando o rendimento em massa em comparação ao processo em duas etapas que necessita primeiramente da extração. Este ajuste de parâmetros encontrado supera o processo convencional de extração dos lipídios com solventes em cerca de 3,9% de lipídios extraídos posteriormente convertidos em ésteres.

4.2.1.1.2 Rendimento mássico para matriz experimental L4 B

Para a matriz L4B, em que se analisou as menores taxas de etanol no meio reacional, a razão etanol/biomassa também mostrou ser o fator de maior impacto na variável resposta, tendo em vista a amplitude no gráfico de efeitos (Figura 29). No entanto, os demais fatores não se mostraram significativos para os níveis escolhidos. Este fato pode ser confirmado pela tabela ANOVA (Tabela 13) onde somente a razão etanol/biomassa (Fator A) foi significativa no nível de 95% de confiança. Assim, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta acontece com o fator A (razão etanol/biomassa) em nível alto (25 mL/g). Os demais fatores, fator B (razão clorofórmio/biomassa) e fator C (razão ácido/biomassa), não influenciaram o processo nessa faixa de volume de etanol determinada. Assim, não foi necessário teste confirmatório, pois somente a razão etanol/biomassa deve ser ajustada em nível alto (25mL/g de etanol).

Figura 29 Gráficos de efeitos principais para as médias de %m/m para as razões etanol/biomassa 25mL/g e 10mL/g (Matriz L4 B)

Fonte: Próprio Autor

Tabela 13 Análise de Variância para as Médias de %m/m da Matriz L4 B

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
A	1	0,052	0,052	51,056	0,000
B	1	0,000	0,000	0,028	0,871
C	1	0,001	0,001	0,519	0,492
Erro	8	0,008	0,001		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio Autor

4.2.1.1.3 Discussões gerais

Analisando de maneira geral as duas matrizes, é possível afirmar que em meio reacional com grande excesso de etanol (100mL/g) ou limitada quantidade de etanol (10mL/g) tem-se os menores rendimento em massa. O primeiro fato pode ser explicado pela diluição excessiva dos demais reagentes no álcool, que perdem seu efeito na etapa de extração dos lipídios. E o segundo fato ocorre

devido à diluição do etanol nos demais reagentes e compromete a etapa de extração.

Sendo assim, é possível afirmar que a maximização do rendimento mássico aconteça com a utilização do etanol na razão de 25 ou 50 mL/w, uma faixa adequada de reagentes no qual não se tem o efeito excessivo da diluição dos reagentes, possibilitando que todos tenham suas ações ocorrendo de forma sinérgica no processo.

4.2.1.2 Efeitos dos fatores para conversão etílica (%EE)

Os percentuais de conversão (Tabela 10 e Tabela 11) estimados pelas áreas do espectro de RMN¹H variaram de 48% a 96%. Para cada condição experimental foi calculado o volume final do meio reacional e também a concentração do ácido sulfúrico no meio reacional (Tabela 14).

Tabela 14 Carga do reator e concentração de ácido sulfúrico em cada condição experimental para TEIS a partir da biomassa seca.

	Experimento	Conversão Etílica (%EE)	Carga do reator (mL)	Concentração H ₂ SO ₄ (mol/L)
Matriz L4 A	1	80,00	55,10	0,03
	2	72,00	66,00	0,28
	3	64,00	106,00	0,18
	4	48,00	115,10	0,16
Matriz L4 B	1	48,00	15,10	0,12
	2	80,00	16,00	1,17
	3	96,00	31,00	0,61
	4	56,00	40,10	0,05

Fonte: Próprio Autor

Para a matriz L4 A os melhores resultados, assim como para a variável resposta %m/m, também, ocorreram quando o nível baixo da razão etanol/biomassa foi utilizado (experimentos 1 e 2). É notável que conforme o volume de carga do reator foi elevado, perdeu-se em rendimento de conversão dos ésteres (Tabela 14). Isso se deve ao fato da diluição dos demais reagentes pelo etanol, em específico, do ácido sulfúrico que catalisa a reação de conversão dos lipídios em ésteres etílicos de ácido graxos. Embora, esperava-se um

aumento da conversão do ensaio 1 para o ensaio 2 devido ao aumento da concentração do ácido sulfúrico (do nível baixo para o nível alto), nota-se que a conversão decresce. Isso se deve ao aumento da quantidade de clorofórmio (do nível baixo para o nível alto) no reator que, por consequência, dificultou a miscibilidade do catalisador no etanol. Desse modo, é importante que a proporção de volumétrica clorofórmio:etanol seja mantida a fim de que a miscibilidade do ácido sulfúrico no etanol não seja prejudicada, e consequentemente, não interfira na atividade do catalisador ácido.

Para a matriz L4 B, as melhores conversões ocorreram ao ajustar o nível da razão ácido sulfúrico/biomassa no nível alto (experimentos 2 e 3), ou seja, 1mL/g, evidenciado que os percentuais em ésteres são maiores quando a concentração de ácido é maior. E, embora, tenha-se maior concentração do ácido sulfúrico no meio reacional no ensaio 2 (1,17 mol/L) em relação ao ensaio 3 (0,61 mol/L), observa-se o decréscimo do percentual de conversão devido a maior proporção clorofórmio:etanol no experimento 2 (clorofórmio em nível alto), o qual prejudicou a miscibilidade do ácido no etanol. Assim como para a matriz L4 A, fica evidente que a quantidade de clorofórmio deve ser proporcional à quantidade de etanol. Embora o clorofórmio ajude na ruptura e extração dos lipídios, observa-se que a conversão é prejudicada em grandes quantidades deste co-solvente.

4.2.1.2.1 Conversão em ésteres etílicos para matriz experimental L4 A

Pela análise dos gráficos de efeitos da matriz experimental L4 A, apresentados na Figura 30, observa-se que as razões etanol/biomassa (fator A) e clorofórmio/biomassa (fator B) são os fatores que possuem maior amplitude, portanto possuem maior efeito sobre a conversão em ésteres. O ajuste sugerido pelo gráfico de efeitos que maximiza a variável resposta %EE é o mesmo sugerido para a variável resposta % m/m, ou seja, o fator A e B no nível baixo (50mL/g de etanol e 5mL/g de clorofórmio, respectivamente). Somente o fator C é sugerido no nível alto (1mL de H₂SO₄ por grama de biomassa). Em variável codificada, o ajuste sugerido fica 1,1,2. Tal ajuste sugere uma condição com menor carga do reator (nível baixo para o etanol e clorofórmio) onde a concentração do ácido sulfúrico não seja muito baixa a ponto de não catalisar eficientemente a reação de síntese de ésteres etílicos. Como o ajuste é o mesmo

sugerido para a análise em rendimento mássico (% m/m), a mesma amostra pode ser utilizada para a análise em RMN¹H para o teste confirmatório da condição experimental sugerida.

Figura 30 Gráficos de efeitos principais para as médias de % EE para as razões etanol/biomassa 100mL/g e 50mL/g (Matriz L4 A)

Fonte: Próprio Autor

O espectro de RMN¹H (Figura 31) da amostra da condição experimental para o teste confirmatório também exibe uma alta conversão em ésteres etílicos, visto a formação do quarteto nítido e intenso, e praticamente sem a presença de outros sinais resultantes de mono, di ou triglicerídeos remanescentes. O teste confirmatório resultou em uma conversão estimada de 88% em ésteres etílicos de ácido graxo, confirmando também que o ajuste sugerido pelo método de Taguchi é de fato o melhor ajuste para os níveis escolhidos. É possível afirmar também que manter a concentração do ácido sulfúrico em níveis mais altos na carga final do reator é a melhor maneira de se obter percentuais maiores de ésteres etílicos.

Figura 31 Espectro de RMN¹H - Experimento confirmatório Matriz L4 A

Fonte: Próprio Autor

4.2.1.2.2 Conversão em éster etílico para matriz experimental L4 B

Para a matriz experimental L4 B, a análise do gráfico de efeitos (Figura 32) mostra que a razão ácido sulfúrico/biomassa apresenta a maior amplitude de efeito, portanto, sendo o fator mais influente no percentual em ésteres etílicos, seguido pela razão etanol/biomassa como fator de grande influência no processo. A razão clorofórmio/biomassa não mostrou ser influente por não apresentar grande amplitude de um nível para outro. Assim, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta “conversão em ésteres etílicos” (% EE) ocorre com o fator A em nível alto (25mL/g de etanol), pois em níveis mais baixos de etanol o ácido estaria em grande concentração. Este ajuste sugerido se encontra na matriz experimental, experimento 3 (Tabela 11), não sendo necessário experimento confirmatório.

Figura 32 Gráficos de efeitos principais para as médias de % EE para as razões etanol/biomassa 25mL/g e 5mL/g (Matriz L4 B)

Fonte: Próprio Autor

4.2.1.2.3 Discussões Gerais

Em ambas matrizes, L4 A e L4 B, é possível afirmar que a garantia da melhor conversão dos lipídios em ésteres de ácido graxos sempre ocorrerá quando a concentração do catalisador ácido for suficientemente alta para garantir a catálise da reação de transesterificação. Portanto, a utilização da quantidade de ácido expressa em termos de concentração é mais adequada. Por conseguinte, no estudo utilizando a biomassa úmida, foi utilizado como parâmetro a concentração do ácido (mol/L). Nos ajustes encontrados no estudo exploratório, foi possível determinar que as concentrações de ácido sulfúrico que melhor catalisam a reação *in situ* são as concentrações de 0,3 mol/L, relativa ao experimento confirmatório da matriz L4A, e 0,6 mol/L, relativa ao experimento 3 da matriz L4B.

Também, para ambas respostas observadas em qualquer uma das duas matrizes, os gráficos de efeitos indicaram que o ajuste da quantidade de clorofórmio deve ser mantido no nível baixo. O clorofórmio é influente no processo

in situ, porém de maneira a atenuar o rendimento quando está em grandes quantidades no meio reacional, pois dificulta a miscibilidade do catalisador no etanol. Portanto, a utilização da quantidade de clorofórmio em menores proporções volumétricas e a manutenção da proporção clorofórmio:etanol constante é o mais adequado. Por conseguinte, no estudo utilizando a biomassa úmida foi utilizado como parâmetro a proporção volumétrica clorofórmio:etanol (v:v).

4.3 Processo *In Situ* a partir da biomassa Úmida

Os experimentos foram feitos em duplicata empregando a metodologia de Taguchi. Foram investigados, simultaneamente, os efeitos de quatro variáveis manipuladas envolvidas no processo de síntese *in situ* de ésteres etílicos de ácido graxos: catalisador ácido; concentração do catalisador (mol/L); razão etanol/biomassa (mL/g); proporção volumétrica clorofórmio:etanol (v:v). A Tabela 15 apresenta os resultados das variáveis respostas: rendimento mássico (% m/m), conversão etílica (%EE) e produção ($\text{kg ésteres} \cdot \text{L meio}^{-1} \cdot \text{kg biomassa}^{-1}$), referentes a cada condição experimental.

Tabela 15 Resultados obtidos no processo *in situ* a partir da biomassa úmida

Experimento	Variável Resposta		
	% m/m	% EE	$\text{kg ésteres} \cdot \text{L meio}^{-1} \cdot \text{kg biomassa}^{-1}$
1	143,82 ± 0,94	76,4 ± 3.96	2,93 ± 0,17
2	131,49 ± 2,39	84,0 ± 4.53	6,42 ± 0,46
3	134,45 ± 1,79	70,4 ± 1.13	2,80 ± 0,01
4	131,98 ± 1,28	37,6 ± 1,14	2,74 ± 0,04
5	133,79 ± 2,53	98,4 ± 1,13	3,69 ± 0,06
6	132,72 ± 0,60	63,6 ± 2.83	4,48 ± 0,26
7	141,17 ± 1,56	48,4 ± 0,57	1,83 ± 0,04
8	127,23 ± 2,37	37,2 ± 1,70	2,77 ± 0,07

Fonte: Próprio Autor

Os percentuais em ésteres etílicos obtidos no processo *in situ* a partir da biomassa úmida foram estimados pelas áreas dos picos de interesse dos espectros de RMN¹H com o auxílio do programa MestReC. Os espectros de

RMN¹H para cada ensaio realizado são apresentados nas Figuras 47 a 54 do Anexo B. Com base nos espectros obtidos, todas as amostras do processo de TEIS da biomassa de microalga apresentaram o quarteto entre 4,05 e 4,35 ppm característico da etoxila de éster (C₂H₅-O).

Em específico, os ensaios 4 e 8 foram os ensaios que apresentaram os menores percentual de conversão, respectivamente, 37,6% ± 1,14 e 37,2% ± 1,70 (Tabela 15) de conversão utilizando-se biomassa úmida. Nota-se que no espectro de RMN¹H de ambos ensaios (Figura 33) que há sobreposição de sinais em 4,15 ppm e a presença de sinais de ressonância entre 4,35 e 4,25 ppm que indicam que a reação de transesterificação foi incompleta. Em contrapartida, o espectro do ensaio 5 (Figura 34) não apresenta sinais de ressonância entre 4,35 e 4,25 ppm oriundos de mono, di ou triglicerídeos. Este experimento converteu em média 98,4% ± 1,13 (Tabela 15) dos lipídios extraídos sendo o ensaio que atingiu a maior conversão no estudo com a biomassa úmida.

Figura 33 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida – a) experimento 4, b) experimento 8

Fonte: Próprio Autor

Figura 34 Espectro de RMN¹H do experimento 5 do processo *in situ* a partir da biomassa úmida

Fonte: Próprio Autor

Em uma análise prévia, ambas variáveis respostas, rendimento mássico e conversão em ésteres etílicos (%mm e %EE), os ácidos (HCl e H₂SO₄) demonstraram não ter efeito sobre as variáveis respostas. Uma análise mais detalhada foi realizada com ferramentas estatísticas no subitem seguinte (4.3.1).

As respostas de rendimento mássico e conversão em ésteres etílicos foram plotados em um gráfico de barras para melhor visualização dos resultados (Figura 35) juntamente com os resultados obtidos com o processo de síntese em duas etapas (Item 4.1).

Figura 35 Gráfico de barras das variáveis resposta rendimento mássico (%m/m) e conversão em ésteres etílicos (%EE) para o processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

Fonte: Próprio Autor

Para a resposta em rendimento mássico, os ensaios apresentaram menor diferenciação de rendimento entre uma condição experimental e outra, indicando que as condições impostas atingiram altos rendimentos no processo de extração. Notou-se que, em todos os casos, foram extraídas maiores quantidade de material lipídico comparado com a extração com solventes no processo em duas etapas. Já para a conversão em ésteres etílicos, observou-se que conforme as condições experimentais foram sendo alteradas a resposta do processo influenciou na conversão dos lipídios.

Os resultados em produção, juntamente com o resultado do processo de síntese em duas etapas, foram plotados no gráfico de barras da Figura 36 para melhor visualização dos resultados.

Figura 36 Gráfico de barras da variável resposta Produção ($\text{kg}_{\text{ésteres}} \cdot \text{L}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$) para o processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

Fonte: Próprio Autor

De acordo com o exposto, foi possível atingir resultados comparáveis com o processo tradicional em duas etapas, com produção similar de ésteres, mesmo com o emprego da biomassa úmida. A produção de ésteres no processo em duas etapas foi de $6,22 \text{ kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{L}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$, enquanto que para o melhor resultado obtido no processo *in situ* a partir da biomassa úmida foi de $6,42 \text{ kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{L}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$.

Considerando que o processo em duas etapas necessita de elevado gasto energético para a separação do óleo extraído da biomassa, posterior secagem do óleo para iniciar a síntese em ésteres e desprender mais tempo de processo, o processo *in situ* atingiu resultados com alto índice de produção de ésteres ($6,42 \text{ kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{L}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$) mesmo empregando biomassa úmida, superando a produtividade do processo em duas etapas, bem como a redução dos gastos energéticos e tempo envolvidos com secagem e extração.

4.3.1 Análise estatística

Todos dos gráficos para a visualização dos efeitos das variáveis manipuladas sobre as variáveis respostas, e a tabela de análise de variância foram gerados pelo software Statistica 13.

4.3.1.1 Efeitos dos fatores para Rendimento Mássico (%m/m)

O gráfico de efeitos para médias em rendimento mássico é apresentado na Figura 37. Pelo gráfico de efeitos, o catalisador ácido escolhido (parâmetro A) mostrou não influenciar no processo de extração reativa. Assim, são esperados resultados próximos tanto para utilização de ácido sulfúrico quanto para o ácido clorídrico, mostrando que, para a etapa de extração, não existe diferença entre utilizar um ou outro ácido. Ainda, a concentração do catalisador ácido (parâmetro B) não mostrou ser significativa para o rendimento em massa.

A razão etanol/biomassa (parâmetro D) mostrou ser a mais significativa tanto na ANOVA (p-value = 0,00004, F-test = 42,376) quanto ao gráfico de efeitos, que mostrou grande amplitude para este parâmetro mostrando que o volume alto de etanol deve ser empregado (50mL).

A proporção clorofórmio:etanol (parâmetro G) também se mostrou significativa para o rendimento em massa (p-value = 0,0004, F-test = 24,619) que também apresentou grande amplitude no gráfico de efeitos, indicando que uma proporção maior de clorofórmio deve ser empregada (1:5 clorofórmio:etanol) a fim de aumentar o rendimento mássico.

Figura 37 Gráficos de efeitos principais para as médias de %m/m do processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

A – Catalisador; B – Concentração do catalisador; D – Razão etanol/biomassa; G – Proporção clorofórmio:etanol.

Fonte: Próprio Autor

Tabela 16 Análise de Variância para as Médias de %m/m do processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
A	1	0,001	0,001	2,221	0,1642
B	1	0,001	0,001	2,330	0,1552
D	1	0,022	0,022	42,376	0,0000
G	1	0,013	0,013	24,619	0,0004
Erro	11	0,006	0,001		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio Autor

Segundo o gráfico de efeitos, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta %m/m segue a seguinte combinação de fatores:

- A (Catalisador) = indiferente
- B (Concentração do catalisador) = indiferente
- D (Razão etanol/biomassa) = nível alto (50 mL/g de etanol)
- G (Proporção clorofórmio:etanol) = nível alto (1:5 clorofórmio:etanol)

Assim, não foi necessário teste confirmatório pois somente o ajuste dos parâmetros D (Razão etanol/biomassa) e G (Proporção clorofórmio:etanol) são indicados como influentes para a maximização da variável resposta %m/m (condições experimentais números 1 e 7, que apresentaram os melhores resultados em %m/m). Pela ANOVA o efeitos dos fatores diminuíram na seguinte ordem: razão etanol/biomassa > proporção clorofórmio:etanol > catalisador > concentração do catalisador. Possivelmente, a razão etanol/biomassa ajustada em nível alto resulta em melhor diluição da umidade presente na biomassa não afetando a ação dos solventes extratores, portanto sendo este parâmetro o qual apresenta o maior efeito o processo da TEIS.

4.3.1.1.1 Discussões Gerais

De modo geral, a alta umidade (84%) aparentemente não afetou o rendimento em massa (%m/m), com as mesmas condições encontradas no processo de TEIS a partir da biomassa seca. Ou seja, as melhores condições encontradas para a utilização da biomassa seca (teste exploratório) podem ser utilizadas para a utilização da biomassa úmida no processo *in situ* sem acarretar em perda de rendimento em massa. Pelo contrário, em todas as condições experimentais com a biomassa úmida, obtiveram-se rendimentos em massa maiores que as condições experimentais com a biomassa seca. Isso pode ter ocorrido, como explica Cohen (1999), pelo efeito do inchaço da estrutura celular (Figura 9 b), devido à parcela de água presente no meio reacional quando utilizado a biomassa úmida.

4.3.1.2 Efeitos dos fatores para Conversão em ésteres etílicos (%EE)

Diferente do rendimento mássico, a conversão em ésteres etílicos variou bruscamente em cada condição experimental, variando de cerca de 37% a 100% na conversão dos ésteres (Tabela 15).

A condição experimental de número 5 apresentou o melhor resultado (102,8% em média), com ácido clorídrico a 0,6 M (nível alto), com 50 mL de etanol (nível alto) e proporção 1:10 clorofórmio:etanol (nível baixo). A alta conversão se deve ao fato do nível alto de etanol (maior volume), permitir que a

água presente na biomassa se dissolva suficientemente no etanol e não interfira na reação de conversão dos lipídios.

Na análise do gráfico de efeitos (Figura 38), o catalisador (parâmetro A) não mostrou influenciar na conversão *in situ* a partir da biomassa úmida (p-value = 0,102; F-test = 3,182), portanto, a utilização de um ácido ou outro não interfere na resposta de conversão em ésteres etílicos. No entanto, a concentração do catalisador (parâmetro B) mostrou ser o principal fator que altera a conversão (p-value = 0,00000, F-test = 122,007). No processo *in situ* a partir da biomassa seca (teste exploratório), os dois níveis de concentração corresponderam aos melhores resultados encontrados para alta conversão dos lipídios. Porém, no processo *in situ* a partir da biomassa úmida as concentrações mostraram ser altamente influenciáveis no processo justamente pelo efeito da presença da umidade no meio reacional.

A razão etanol/biomassa (parâmetro D) mostrou ser significativa para o processo (p-value = 0,0001, F-test = 37,283), que no gráfico de efeitos, mostrou grande amplitude para este parâmetro, apontando para o uso do volume alto de etanol (50mL). A proporção clorofórmio:etanol (parâmetro G), que em níveis altos afeta negativamente o processo de conversão (p-value = 0,0002, F-test = 30,124), deve ser mantida próxima de 1:10.

Figura 38 Gráficos de efeitos principais para as médias de %EE do processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

A – Catalisador; B – Concentração do catalisador; D – Razão etanol/biomassa; G – Proporção clorofórmio:etanol.

Fonte: Próprio Autor

Tabela 17 Análise de Variância para as Médias de %EE do processo *in situ* a partir da biomassa úmida.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
A	1	0.011	0.011	3.182	0.1020
B	1	0.415	0.415	122.007	0.0000
D	1	0.127	0.127	37.283	0.0001
G	1	0.102	0.102	30.124	0.0002
Erro	11	0.037	0.003		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio Autor

Segundo o gráfico de efeitos, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta %EE segue a seguinte combinação de fatores:

- A (Catalisador) = indiferente
- B (Concentração do catalisador) = nível alto (0,6mol/L)
- D (Razão etanol/biomassa) = nível alto (50 mL/g de etanol)
- G (Proporção clorofórmio:etanol) = nível baixo (1:10 clorofórmio:etanol)

Assim, não foi necessário teste confirmatório pois o ajuste dos parâmetros B (concentração do catalisador), D (Razão etanol/biomassa) e G (Proporção clorofórmio:etanol) leva à condição experimental número 5, que apresentou o melhor resultado em percentual em ésteres etílicos ($98,4\% \pm 1,13$). Pela ANOVA o efeitos dos fatores diminuíram na seguinte ordem: Concentração do catalisador > Razão etanol/biomassa > Proporção clorofórmio:etanol > Catalisador.

4.3.1.2.1 Discussões Gerais

Como esperado, a conversão é afetada pela umidade da biomassa, apresentando em alguns casos baixa conversão em ésteres. No entanto, os resultados de algumas condições experimentais mostraram-se satisfatórios e algumas proporções de reagentes superam o efeito negativo da umidade no processo *in situ*. A proporção de reagentes deve conter um maior volume de etanol para que água oriunda da biomassa úmida seja melhor diluída; e que uma menor quantidade de clorofórmio seja adicionada para que o sistema ternário etanol-clorofórmio-água possa incluir a maior quantidade possível de água, ou seja, quando aplicadas quantidades maiores de clorofórmio, menor quantidade água é incluída no sistema ternário.

4.3.2 Desempenho de Produção

O desempenho de produção para cada condição experimental foi calculado afim de visualizar a condição experimental que apresenta o maior rendimento em ésteres etílicos utilizando a menor quantidade de meio reacional. (Tabela 15 e Figura 36). Em termos de produção (Figura 36) a única condição de processo *in situ* que equiparou com o processo em duas etapas foi o experimento 2, onde o processo em duas etapas teve um desempenho de produção de $6,22 \text{ kg.L}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ enquanto o experimento 2 apresentou um desempenho de produção de $6,42 \text{ kg.L}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. As demais condições experimentais tiveram um desempenho menor que o processo em duas etapas, portanto, é esperado um gasto mais elevado de reagentes por parte dessas condições experimentais que apresentaram baixo desempenho de produção.

Nota-se, então, que embora os ensaios 1 e 7 da matriz experimental apresentaram bom rendimento em massa, condições experimentais sugeridas

pela metodologia de Taguchi para a maximização do rendimento mássico, não possuem um bom desempenho de produção (2,93 e 1,83 kg.L⁻¹.kg⁻¹, respectivamente) pois melhoram o rendimento mássico a custo de maior gasto com reagentes. O mesmo acontece com o melhor ajuste sugerido pela metodologia de Taguchi para a conversão em ésteres etílicos, o ensaio 5 da matriz experimental melhorou a conversão em ésteres a custo de maior gasto com reagentes, levando a um desempenho de produção menor que o processo em duas etapas.

No entanto, o ensaio 2 é a condição experimental que apresenta a melhor produção em ésteres etílicos por litro de reagentes utilizado, é esperado um menor custo por grama de éster produzido pelo fato dessa condição experimental utilizar menor quantidade de reagentes. Assim, fica claro que o processo *in situ*, nas condições encontradas (experimento 2 da matriz experimental L8), pode se tornar competitivo com o processo em duas etapas, poupando reagentes e tempo de mão obra, ou seja, um maior potencial para um processo economicamente viável. O processo ainda pode ser mais estudado a fim de obter maiores conversões dos lipídios em ésteres etílicos de ácido graxo.

5 CONCLUSÕES

Este estudo confirmou a viabilidade técnica da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* como matéria prima para a produção de biodiesel. A síntese *in situ* para a biomassa mostrou-se promissor para produção dos ésteres etílicos para serem utilizados como alternativa ao diesel convencional.

Em linhas gerais, podemos afirmar que, para a microalga *Chlorella minutissima*, a maximização dos rendimentos em ésteres via *in situ* ocorre entre 25mL e 50mL de álcool etílico por grama de biomassa seca. Estes níveis de etanol mostraram bons rendimentos mássicos na TEIS a partir da biomassa seca. Sendo que baixos volumes de etanol ou volumes superiores a 100 mL afetam negativamente o processo *in situ*.

No processo de TEIS, a partir da biomassa úmida, os rendimentos mássicos foram melhores com a presença da umidade, atingindo os percentuais de 132% a 143% em relação ao processo em duas etapas. No entanto, a catálise da reação foi drasticamente afetada pela presença da umidade, apresentando conversões de 37% a 100%. Os catalisadores ácido, tanto HCl quanto H₂SO₄, exibiram o mesmo desempenho de catálise. Ambas catálises, foram afetadas igualmente pela presença umidade da biomassa. Apesar disto, com a metodologia de Taguchi foi possível determinar uma condição na qual a água presente foi suficientemente diluída no etanol e catalisar o processo *in situ* com a biomassa úmida.

Em termos de produção, apenas a condição experimental 2 da matriz envolvendo o uso da biomassa úmida foi capaz de alcançar um desempenho semelhante as obtidas para o processo em duas etapas. As outras condições experimentais, embora tenham extraído maiores quantidades de material comparado ao processo em duas etapas, apresentaram baixa conversão e/ou utilizaram larga quantidade de reagentes. O ensaio experimental número 2 foi a condição que apresentou maior potencial para um processo economicamente viável ao se produzir ésteres etílicos brutos a partir da biomassa úmida. Ou seja, a condição experimental número 2 produziu a maior quantidade de ésteres com o menor custo de reagentes envolvidos.

Desta forma, conclui-se que o processo de TEIS a partir da biomassa úmida da microalga *Chlorella minutissima* é um processo promissor para a produção de ésteres etílicos brutos tendo em vista a produção de biodiesel, evitando e reduzindo a aplicação de solvente tóxicos como o metanol e clorofórmio, respectivamente, sem a necessidade de aplicar condições reacionais limitadas pela construção ou segurança do projeto como irradiação de micro-ondas ou condições supercríticas.

6 RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto os resultados promissores, recomenda-se que estudos futuros possam abordar:

- A utilização de catalisadores heterogêneos;
- A reutilização da biomassa residual para a produção de outros biocombustíveis;
- A sacarificação da biomassa durante o processo para posterior produção de bioetanol;
- A recuperação do clorofórmio, etanol e catalisador;
- O projeto do reator e as suas características para o aumento de escala;
- O modo de operação do reator (semi-batelada ou contínuo);
- A modelagem do processo incluindo a reciclagem de etanol, o custo do processo de transformação e tratamento de resíduos;
- A utilização de outras biomassas, como biomassa residual agrícola;

REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Boletim mensal do Biodiesel: Janeiro 2016**. Brasília DF: Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis, 2016.

AMARAL, M. D. S. **Cultivo da microalga marinha Chlorella sp. como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. .: 2014. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

ANUAR, M. R.; ABDULLAH, A. Z. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 208–223, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 1959.

BP GLOBAL. **Statistical review of World Energy**. Londres: BP Statistical Review of World Energy, 2016. Disponível em: <<https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2016/bp-statistical-review-of-world-energy-2016-full-report.pdf>>.

BRASIL, B. S. A. .; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2016.

BRASIL, M. DE M. E. E. **Produção de biodiesel cresce 10% em um ano**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis-renovaveis/pagina-inicial/spg-destaques/-/asset_publisher/hq42wpm81ruP/content/producao-de-biodiesel-cresce-10-em-um-ano;jsessionid=C07E1C6E1C332466E9FD0967DCA21ACC.srv154?red>. Acesso em: 10 fev. 2016.

BROWNBIDGE, G. et al. The future viability of algae-derived biodiesel under economic and technical uncertainties. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 166–173, 2014.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. D. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 309–317, 2010.

CARVALHO, R. MIGUEL DE. **Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise in situ**. .: 2010. 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHISTI, Y. The status of biofuels... **Biofuel Research Journal**, v. 7, p. 253, 2015.

CHOI, W. Y. et al. High quality biodiesel from marine microalga, *Scenedesmus* sp. through in situ acid transesterification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 7, p. 1245–1252, 2015.

COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. Londres: Taylor& Francis, 1999.

CORREIA, E. A. S.; CARDOZA, J. A. S. Planejamento de experimentos no processo produtivo utilizando o método Taguchi. **Gestão da Produção, Operações e Sistemas (GEPROS)**, v. 6, p. 55–66, 2010.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.

DONALD L. PAVIA et al. **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, mar. 2010.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRIGUEZ-REINARES, A. Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 15, p. 5491–5499, 2005.

GAIVÃO, J. J. R. P. DE M. **Aplicação de diferentes metodologias na produção de biodiesel a partir da microalga Nannochloropsis sp .** .: 2013. 78p. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais.** .: 2006. 136p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GO, A. W. et al. Developments in in-situ (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 284–305, 2016.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** New York: Plenum, 1975.

GUPTA, S.; MALIK, A.; BUX, F. **Algal Biofuels: Recent Advances and Future Prospects.** 1. ed. eBook: Springer International Publishing, 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.

HATTAB, M.; GHALY, A. Production of biodiesel from marine and freshwater microalgae: a review. **Advances in Research**, v. 3, n. 2, p. 107–155, 2015.

HIDALGO, P. et al. Improving the FAME Yield of *in Situ* Transesterification from Microalgal Biomass through Particle Size Reduction and Cosolvent Incorporation.

Energy & Fuels, p. 150114144614009, 2015a.

HIDALGO, P. et al. Biodiesel synthesis by direct transesterification of microalga *Botryococcus braunii* with continuous methanol reflux. **Bioresource technology**, v. 181, p. 32–9, abr. 2015b.

ILLMAN, A. .; SCRAGG, A. .; SHALES, S. . Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 631–635, nov. 2000.

IM, H. et al. Concurrent extraction and reaction for the production of biodiesel from wet microalgae. **Bioresource technology**, v. 152, p. 534–7, jan. 2014.

IM, H.; KIM, B.; LEE, J. W. Concurrent production of biodiesel and chemicals through wet in situ transesterification of microalgae. **Bioresource technology**, v. 193, p. 386–92, out. 2015.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Production of biodiesel fuel from the microalga *schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. **Energy and Fuels**, v. 23, n. 10, p. 5179–5183, 2009.

KARIMI, M. Exergy-based optimization of direct conversion of microalgae biomass to biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 141, p. 50–55, 2017.

KASIM, F. H.; HARVEY, A. P.; ZAKARIA, R. Biodiesel production by in situ transesterification. **Biofuels**, v. 1, n. 2, p. 355–365, 2010.

KIM, B.; IM, H.; LEE, J. W. In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. **Bioresource technology**, v. 185, p. 421–5, jun. 2015.

KIM, D.-Y. et al. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, ago. 2015a.

KIM, D.-Y. et al. An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 469–474, set. 2015b.

KIM, G. V. et al. Enhancement of biodiesel production from marine alga *scenedesmus* sp. through in situ transesterification process associated with acidic catalyst. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KIM, T.-H. et al. Development of direct conversion method for microalgal biodiesel production using wet biomass of *Nannochloropsis salina*. **Bioresource technology**, v. 191, p. 438–44, set. 2015c.

KUCEK, K. T. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. .: 2004. 123p. Dissertação (Mestrado em química orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KWIETNIEWSKA, E. et al. **Microalgae : cultivation and application of biomass as a source of energy: a review**. Lublin: Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, 2012.

LEMÕES, J. S. **Síntese de Ésteres Graxos de Chlorella sp . utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação in situ**. .: 2011. 70p. Dissertação (Mestrado em química tecnológica e ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 2, p. 107–116, dez. 2000.

LÖFFLER, K. et al. The future of industrial biorefineries. **World Economic Forum**, p. 40, 2010.

LOONG, T. C.; IDRIS, A. One step transesterification of biodiesel production using simultaneous cooling and microwave heating. **Journal of Cleaner Production**,

2016.

LOPEZ-GONZALEZ, D. et al. Kinetic analysis and thermal characterization of the microalgae combustion process by thermal analysis coupled to mass spectrometry. **Applied Energy**, v. 114, p. 227–237, 2014.

LOURES, C. C. A. **Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. [s.l.] 2016. 153p. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid – An efficient biodiesel yield and its characterization. **Renewable Energy**, v. 81, p. 523–533, 2015.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841–846, 2006.

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Kinetic and thermodynamic studies on biodiesel production from *Spirulina platensis* algae biomass using single stage extraction–transesterification process. **Fuel**, v. 135, p. 228–234, 2014.

NELSON, D. R.; VIAMAJALA, S. One-pot synthesis and recovery of fatty acid methyl esters (FAMES) from microalgae biomass. **Catalysis Today**, v. 269, p. 29–39, 2016.

PACIFIC BIODIESEL. **Biodiesel benefits - why use biodiesel?** Disponível em: <<http://www.biodiesel.com/biodiesel/benefits/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

PETKOV, G. et al. A critical look at the microalgae biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 2, p. 103–111, 2012.

PORPHY, S. J.; FARID, M. M. Feasibility study for production of biofuel and chemicals from marine microalgae *nannochloropsis* sp. based on basic mass and energy analysis. **ISRN Renewable Energy**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

POSADA, J. A. et al. Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. **Algal Research**, v. 17, p. 113–131, 2016.

POSTEN, C.; WALTER, C. **Microalgal biotechnology: potential and production**. 1. ed. Berlin/Boston: De Gruyter, 2012.

PROCÓPIO, Z. S. D. **Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação in situ**. .: 2014. 93p. Dissertação (Mestrado)- Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

RANJIT, R. K. **A primer on the Taguchi Method**. 2^a ed. New York: Society of Manufacturing Engineers, 2010.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, mar. 2013.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-product-a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 1179–1198, 2016a.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. Surfactant-assisted direct biodiesel production from wet *Nannochloropsis oculata* by in situ transesterification/reactive extraction. **Biofuel Research Journal-Brj**, v. 3, n. 1, p. 366–371, 2016b.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. Kinetics of fast alkali reactive extraction / in situ transesterification of *Chlorella vulgaris* that identifies process conditions for a significant enhanced rate and water tolerance. **Fuel Processing Technology**, v. 144, p. 212–219, 2016c.

SCOTT, S. A. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277–286, 2010.

SEO, Y. H. et al. Lipid extraction and esterification for microalgae-based biodiesel production using pyrite (FeS₂). **Bioresource technology**, v. 191, p. 420–5, set. 2015.

SILVA, M. B. et al. An application of the taguchi method (Robust Design) to environmental engineering : evaluating advanced oxidative processes in polyester-resin wastewater treatment. **American Journal of Analytical Chemistry**, p. 828–837, 2014.

SILVA, W. L. G. et al. Separation of the glycerol-biodiesel phases in an ethyl transesterification synthetic route using water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1745–1750, 2015.

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; GUMBYTE, M. Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae : a review. **Fuel Processing Technology**, v. 150, p. 78–87, 2016.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

SUGANYA, T. et al. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2016.

SUH, W. I. et al. Direct transesterification of wet microalgal biomass for

preparation of biodiesel. **Algal Research**, v. 12, p. 405–411, nov. 2015.

THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.-M. Microorganisms as sources of oils. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 20, n. 6, p. D603, 2013.

TOMASELLI, L. The Microalgae: with reference to mass-cultivation. In: RICHMOND, A. (Ed.). . **Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology**. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. p. 3–19.

TREVISAN, E. et al. **Avaliação dos solventes hexano e clorofórmio em reações de transesterificação in situ de Chlorella vulgaris**. Maringá - PR: VIII Encontro Internacional de Produção Científica, 2013

US ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. **Energy consumption by primary fuel**. Disponível em: <http://www.eia.gov/forecasts/aeo/section_energyconsump.cfm>. Acesso em: 10 fev. 2016.

VIÊGAS, C. V. et al. A route to produce renewable diesel from algae: synthesis and characterization of biodiesel via in situ transesterification of Chlorella alga and its catalytic deoxygenation to renewable diesel. **Fuel**, v. 155, p. 144–154, set. 2015.

VÖLZ, M. D. DE Á. **Óleos de alta acidez: desenvolvimento de um processo catalítico homogêneo**. .: 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em química tecnológica e ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 2724–30, fev. 2011.

WANG, C. et al. Technologies for extracting lipids from oleaginous

microorganisms for biodiesel production. **Frontiers in Energy**, v. 6, n. 3, p. 266–274, 2012.

WWAP (WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME). **Relatório mundial das nações unidas sobre o desenvolvimento dos recursos hídricos 4**. Paris: UNESCO, 2012.

ZHANG, X. et al. Ultrasonication aided biodiesel production from one-step and two-step transesterification of sludge derived lipid. **Energy**, v. 94, p. 401–408, 2016.

ZORN, S. M. F. E. et al. **Avaliação dos Fatores envolvidos na Extração de Lipídios da Biomassa da Microalga *Chlorella minutíssima* Via Solventes**. Angra dos Reis-RJ: II Congresso Iberoamericano de Empreendedorismo, Energia, Meio Ambiente e Tecnologia – CIEEMAT, 2016

ANEXO A – Espectros de RMN¹H do processo de TEIS a partir da biomassa seca

Figura 39 Espectro de RMN¹H - Experimento 1 Matriz L4 A

Fonte: Próprio Autor

Figura 40 Espectro de RMN¹H - Experimento 2 Matriz L4 A

Fonte: Próprio Autor

Figura 41 Espectro de RMN¹H - Experimento 3 Matriz L4 A

Fonte: Próprio Autor

Figura 42 Espectro de RMN¹H - Experimento 4 Matriz L4 A

Fonte: Próprio Autor

Figura 43 Espectro de RMN¹H - Experimento 1 Matriz L4 B

Fonte: Próprio Autor

Figura 44 Espectro de RMN¹H - Experimento 2 Matriz L4 B

Fonte: Próprio Autor

Figura 45 Espectro de RMN¹H - Experimento 3 Matriz L4 B

Fonte: Próprio Autor

Figura 46 Espectro de RMN¹H - Experimento 4 Matriz L4 B

Fonte: Próprio Autor

ANEXO B – Espectros de RMN¹H do processo de TEIS a partir da biomassa úmida

Figura 47 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 1

Fonte: Próprio Autor

Figura 48 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 2

Fonte: Próprio Autor

Figura 49 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 3

Fonte: Próprio Autor

Figura 50 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 4

Fonte: Próprio Autor

Figura 51 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 5

Fonte: Próprio Autor

Figura 52 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 6

Fonte: Próprio Autor

Figura 53 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 7

Fonte: Próprio Autor

Figura 54 Espectro de RMN¹H do processo *in situ* a partir da biomassa úmida - Experimento 8

Fonte: Próprio Autor

APÊNDICE A - TEIS a partir da biomassa seca utilizando metanol e pré-tratamento em ultrassom

Este estudo paralelo investigou a utilização de metanol e o pré-tratamento da biomassa em ultrassom na TEIS a partir da biomassa seca da microalga *Chlorella minutissima*. Estudou-se simultaneamente os efeitos de quatro variáveis envolvidas no processo de síntese de biodiesel: Razão metanol/biomassa (A), Razão clorofórmio/biomassa (B), Razão ácido sulfúrico/biomassa (C) e Utilização ou não de Ultrassom (D).

A.1 Condições experimentais

Os mesmos procedimentos experimentais descritos no item 3.3, mantendo-se 95°C e 90 minutos de reação. O pré-tratamento em ultrassom foi realizado de modo similar a extração, em que todos os reagentes foram colocados no balão de fundo redondo e mantido em banho ultrassônico (25°C, e com frequência ultrassônica de 40Hz durante 50 minutos).

A.2 Matriz experimental L8 de Taguchi

Conforme apresentado, foram montadas as seguintes condições de operação da reação para a análise exploratória, apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Fatores e níveis da reação de transesterificação utilizando metanol e pré-tratamento em ultrassom.

Fator Codificado	Fator	1 (Nível Baixo)	2 (Nível Alto)
A	Razão metanol/biomassa (mL/g biomassa)	10	125
B	Razão clorofórmio/biomassa (mL/g biomassa)	1	12
C	Razão ácido sulfúrico/biomassa (mL/g biomassa)	1	12
D	Pré-tratamento em Ultrassom	sem	com

Fonte: Próprio Autor

Para tanto, foi utilizado um planejamento fatorial em duplicata através de uma matriz ortogonal de Taguchi L₈, conforme a Tabela 19.

Tabela 19 - Matriz experimental L8 de Taguchi com sete fatores e dois níveis.

Experimento	Fatores			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	1	1	2
3	1	2	2	1
4	1	2	2	2
5	2	1	2	1
6	2	1	2	2
7	2	2	1	1
8	2	2	1	2

Fonte: Próprio Autor

A variável resposta analisada foi o rendimento mássico (%m/m).

A.3 Resultados

A matriz experimental e os resultados obtidos em duplicata são apresentados na Tabela 20. Cada condição experimental é apresentada nas linhas da tabela e cada coluna refere-se a uma variável do processo.

Tabela 20 Matriz experimental e resultados obtidos na transesterificação *in situ* com a utilização de metanol e pré-tratamento em ultrassom.

Experimento	Fator				Resposta
	A	B	C	D	%m/m
1	1	1	1	1	17,88 ± 1,10
2	1	1	1	2	18,98 ± 1,65
3	1	2	2	1	16,87 ± 0,32
4	1	2	2	2	29,42 ± 1,58
5	2	1	2	1	64,74 ± 3,45
6	2	1	2	2	38,17 ± 1,29
7	2	2	1	1	57,15 ± 3,94
8	2	2	1	2	56,70 ± 0,13

A – Etanol; B – Clorofórmio; C – Ácido Sulfúrico; D – Ultrassom
Fonte: Próprio Autor

Os rendimentos mássicos obtidos na conversão direta de lipídios variam de 17% a pouco mais de 64%, sendo essa maior conversão encontrada no experimento 5. Ainda assim, os experimentos 7 e 8 apresentaram rendimentos próximos ao rendimento do experimento 5, evidenciando que o ajuste da razão metanol/biomassa no nível alto, 125 mL/g de biomassa promove um maior rendimento.

Observa-se, também, que nos experimentos 3 e 4, que se diferenciam apenas pelo pré-tratamento com ultrassom, este ocasionou um salto de 16,88% para 29,42%. No entanto, para níveis altos de metanol, os experimentos 5 e 6, que também se diferenciam apenas pelo fator D, mostraram o efeito contrário quando comparados aos experimentos 3 e 4. Nesse caso, o pré-tratamento com ultrassom atenuou o rendimento mássico do processo de TEIS.

A.3.1 Análise Estatística

A.3.1.1 Efeitos dos Fatores

Em linhas gerais, a razão metanol/biomassa mostrou ser o fator de maior impacto na resposta, maximizando o rendimento da reação. Como visto, isso é esperado, pois a síntese de biodiesel se trata de uma reação química de equilíbrio, assim, o excesso de um dos reagentes, no caso, o álcool que participa da reação, garante o deslocamento da reação para formação de produtos e, também, a solubilização da biomassa no meio reacional.

O maior efeito da razão metanol/biomassa pode ser confirmado na Tabela 21 (Tabela ANOVA) em que o fator A (razão metanol/biomassa) mostrou grande significância pelo alto valor no teste F. Os demais fatores não se mostraram significativos para o processo pois apresenta incerteza no p-valor, sendo descartados pela análise estatística.

É interessante notar que, no caso do pré-tratamento em ultrassom, a ANOVA demonstra que o pré-tratamento é dispensável nas condições reacionais adotadas, confirmando a afirmação de SKORUPSKAITE e colaboradores (2016) de que o ultrassom não tem efeitos positivos no rendimento de produtos quando utilizando no processo de TEIS.

Tabela 21 Análise de Variância para as Média e razão Sinal/Ruído da Matriz Experimental na transesterificação *in situ* com a utilização de metanol e pré-tratamento em ultrassom

	Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Médias	A	1	2231,67	2231,67	82,75	0,07
	B	1	51,85	51,85	1,92	0,398
	C	1	0,28	0,28	0,01	0,935
	D	1	22,31	22,31	0,83	0,53
	A*D	1	206,74	206,74	7,67	0,221
	B*D	1	176,42	176,42	6,54	0,237
	Erro	1	26,97	26,97	-	-
S/N	A	1	140,908	140,908	22023,04	0,004
	B	1	4,065	4,065	635,32	0,025
	C	1	0,127	0,127	19,79	0,141
	D	1	0,06	0,06	9,43	0,2
	A*D	1	12,308	12,308	1923,63	0,015
	B*D	1	9,802	9,802	1532,02	0,016
	Erro	1	0,006	0,006	-	-

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.
Fonte: Próprio Autor

A análise dos gráficos de efeitos (para as médias e razão S/R), apresentados na Figura 55 sinaliza que, para a maximização do rendimento da síntese do biodiesel, os fatores A (razão metanol/biomassa) e B (razão clorofórmio/biomassa) devem ser ajustados nos níveis altos, ou seja, 125 mL de metanol por grama de biomassa e 12 mL de clorofórmio por grama de biomassa, respectivamente.

No entanto, na matriz experimental se observa que o melhor rendimento ocorreu no experimento 5 no qual o fator A (razão metanol/biomassa) foi ajustado no nível alto e o fator B (razão clorofórmio/biomassa) ajustado no nível baixo, contrariando a conclusão da análise dos gráficos de efeitos em que o a fator B deveria ser ajustado no nível alto. Tal fato pode ser explicado pelo baixo valor-p tendo incerteza na análise desse fator.

Quanto ao fator D, é possível afirmar que o uso de ultrassom no processo de TEIS é dispensável pois não apresenta melhoria no rendimento do processo e nem influência negativamente o processo.

Figura 55 Gráficos dos efeitos principais (a) para as médias e (b) para as Razões S/N

(a)

(b)

Fonte: Próprio Autor

A.3.2 Análise de RMN¹H

A amostra do ensaio 5, experimento que apresentou maior rendimento mássico, foi analisada via RMN¹H para a confirmação da formação de ésteres metílicos (Figura 56)

Figura 56 Espectro de RMN¹H da amostra do ensaio 5 da matriz experimental

Fonte: Próprio Autor

A presença do biodiesel metílico na amostra é confirmada pelo singleto em 3,64 ppm característico de metoxila de éster. A proporção de biodiesel metílico e óleo não convertido na reação de transesterificação, conforme apresentado por Garcia (2006), pode ser determinado relacionando a área do singleto em 3,64 ppm, área dos hidrogênios metoxílicos presentes somente nos ésteres metílicos, e a área do triplete próximo a 2,29 ppm, área dos hidrogênios do metileno α -carbonílico presentes tanto nos ésteres quanto nos lipídios. As áreas dos respectivos picos foram calculadas pelo programa MestReC. A amostra apresentou uma conversão de 84,7% dos lipídios em ésteres metílicos.

A.4 Conclusões

O processo de TEIS a partir da biomassa seca com a utilização de metanol e o pré-tratamento da biomassa em ultrassom apresentou um rendimento mássico em torno de 64%, sendo foram convertidos de 84,7% dos lipídios extraídos. A razão metanol/biomassa na reação provou ser indispensável para atingir o maior valor da variável resposta.

No entanto, o pré-tratamento com ultrassom mostrou-se não ser eficaz quando trabalhado em grandes quantidades de metanol. Logo, o pré-tratamento

em ultrassom no processo de TEIS é dispensável pois não apresenta melhoria no rendimento do processo.