

II-037 – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA A EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS A PARTIR DE CULTURAS MISTAS DE MICROALGAS

Anna Patrícia Florentino de Souza Silva

Bióloga pela Universidade Estadual do Ceará. Mestre em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará. Doutoranda em Microbiologia na Wageningen University.

Mayara Carantino Costa

Engenheira Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Saneamento Ambiental pela UFC. Doutora em Saneamento Ambiental pela UFC. Pesquisadora pós-doc (Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental - UFC).

Eliezer Fares Abdala Neto

Engenheiro Mecânico pela Universidade de Fortaleza. Mestre em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutor em Saneamento Ambiental pela UFC. Pesquisador pós-doc (Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental - UFC).

Alexandre Colzi Lopes

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo. Doutor em Engenharia Química e Tecnologia do Meio ambiente pela Universidad de Valladolid. Pesquisador pós-doc (Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental - UFC).

André Bezerra dos Santos ⁽¹⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Saneamento Ambiental pela UFC. Doutor em Saneamento Ambiental pela Wageningen University. Professor Adjunto IV do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental na UFC.

Endereço⁽¹⁾: Avenida Mister Hull S/N - Campus do Pici - Bloco 713 - Pici.- Fortaleza – Ceará – CEP: 60455-900 – Brasil - Tel: (85) 3366-9490 - e-mail: andre23@ufc.br

RESUMO

Uma das etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas é a ruptura celular, que pode ser conseguida pela aplicação de pré-tratamento, que uma vez aplicado à biomassa algal deve ser capaz de aumentar a liberação dos lipídios das células. Este trabalho estabeleceu uma comparação entre quatro métodos de pré-tratamento (ultrassom, micro-ondas, autoclave e eletroflotação não-convencional) quanto à eficiência de ruptura celular de culturas mistas de microalgas obtidas de uma estação de tratamento de esgotos constituída por lagoas de estabilização. Para determinação do rendimento lipídico, foi realizada a extração de lipídios totais pela metodologia adaptada de Bligh e Dyer. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os pré-tratamentos aplicados, exceto para o método de micro-ondas que foi estatisticamente diferente do ultrassom e da autoclave. Em termos de rendimento lipídico, foram obtidos: 33,7% para o micro-ondas, 24,8% para a eletroflotação não-convencional, 15,4% para a autoclave e 13,3% para o ultrassom. O reator de eletroflotação não-convencional foi apontado como um método promissor, sobretudo por ser facilmente projetado para maiores escalas, permitir a separação de microalgas e pela produção de hidrogênio no processo, que poderia ser reaproveitado, além de apresentar menores custos energéticos quando comparado às metodologias tradicionais.

PALAVRAS-CHAVE: Microalgas, Lagoas de Estabilização, Pré-tratamento, Lipídios, Biodiesel.

INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis podem ser obtidos a partir de uma variedade de biomassas oriundas de restos de comida, lixo urbano e da agricultura, sementes oleaginosas, plantas aquáticas e microalgas (SINGH e GU, 2010). No Brasil, a principal oleaginosa utilizada na obtenção do biodiesel, responsável por 75% da produção, a soja, não atenderá a demanda sem que sejam destinadas áreas agricultáveis exclusivamente para esse fim, uma vez que a produtividade dessa oleaginosa é baixa (0,2 – 0,4 tonelada por hectare) (MENDES e COSTA, 2010). Nesse cenário, as microalgas aparecem como fontes promissoras de biodiesel, apresentando produtividade e teor lipídico muito superiores às oleaginosas tradicionalmente utilizadas (CHISTI, 2007).

A biomassa microalgal é obtida principalmente a partir do cultivo em laboratório ou industrial em sistemas fechados (fotobiorreatores), ou em lagoas aeradas alimentadas com meio de cultura (BOROWITZKA, 1999). Entretanto, a aplicação de microalgas em sistemas de tratamento de esgotos domésticos aliada à produção de biomassa para conversão a biodiesel vem sendo discutida e tem sido apontada como opção economicamente viável (RAWAT *et al.*, 2010; PITTMAN *et al.*, 2011).

A ruptura celular é uma das etapas fundamentais para o aproveitamento energético da biomassa algal. Alguns pré-tratamentos, como ultrassom, micro-ondas, choque osmótico, moinho de esferas e autoclave têm sido usados para promover a ruptura de células vegetais e têm sido testados para células de culturas puras de microalgas (KITA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; PRABAKARAN e RAVINDRAN, 2011; HALIM *et al.*, 2012). Embora os efeitos do pré-tratamento para rompimento celular na extração de lipídios de microalgas ainda não tenham sido extensivamente investigados, essa etapa não pode ser desconsiderada, uma vez que a eficiência da extração aumenta com o grau de ruptura celular, uma vez que promove a liberação de produtos intracelulares, como os lipídios (LEE *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi comparar quatro métodos de pré-tratamento (ultrassom, micro-ondas, autoclave e eletroflotação não-convencional) quanto à eficiência de ruptura celular de culturas mistas de microalgas obtidas em efluentes de lagoas de estabilização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e concentração da biomassa

As microalgas foram coletadas em uma estação de tratamento de esgotos (ETE) constituída por uma lagoa aerada facultativa seguida de uma lagoa facultativa secundária e duas lagoas de maturação em série. As amostras foram coletadas na última lagoa de maturação, na saída do efluente.

A biomassa foi concentrada a $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ com uma rede de plâncton de $20 \mu\text{m}$ de abertura. A secagem foi realizada por liofilização (Liotop, L202, Brasil). Os lipídios foram extraídos pelo método modificado de Bligh e Dyer (1959) e para ajustar os pré-tratamentos utilizados com o método, os experimentos foram divididos em dois blocos, um realizando a ruptura da célula com a biomassa seca e o outro com a biomassa úmida, sendo a secagem procedida após o pré-tratamento. Para o grupo controle, nenhum pré-tratamento foi realizado. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e a extração dos lipídios totais partiu de 500 mg de biomassa seca.

Pré-tratamento da biomassa seca: ultrassom e micro-ondas

A extração por ultrassom assistida foi realizada em um processador ultrassônico de 80 W (Ultra cleaner, 1600A, Unique, Austrália), usando uma frequência de 40 KHz. A biomassa (500 mg) foi diluída em 2,5 mL de metanol, 1,25 mL de clorofórmio e 1 mL de água deionizada e então foi levada ao banho ultrassônico por 40 minutos. Em seguida, 1,25 mL de clorofórmio e 1,25 mL de sulfato de sódio 1,5% foram adicionados e a solução foi levada novamente ao banho ultrassônico por 20 minutos.

A extração por micro-ondas assistida foi realizada em um aparelho de micro-ondas de 400 W (Mars 5, CEM Corporation, USA). A biomassa (500 mg) foi diluída em 2,5 mL de metanol, 2,5 mL de clorofórmio, 1,25 mL de 1,5% sulfato de sódio e 1,0 mL de água deionizada, e então a solução foi levada ao micro-ondas para ser aquecida durante 3 ciclos, sendo cada ciclo com 70 segundos de radiação em uma rampa de temperatura de 100°C e 45 segundos em espera.

Após cada pré-tratamento, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm (Excelsa II 206 BL, Famen, Brasil) por 2 minutos e o *pellet* formado foi filtrado a vácuo. O filtrado foi levado à estufa a 100°C até atingir peso constante.

Pré-tratamento da biomassa aquosa: eletroflotação não-convencional (EFNC) e autoclave

Para os experimentos de eletroflotação não-convencional (EFCN) por corrente alternada, um reator eletrolítico (figura 1) foi desenvolvido para operação em batelada. O cátodo e o ânodo foram feitos de 5 barras de aço-316 medindo $15 \times 5 \text{ cm}$, 0,2 mm de espessura e espaçadas a 5 mm. Uma fonte alternativa externa de corrente (HY 125 Hobby, Hayama, Brasil) foi ajustada para operar a uma frequência máxima de 1,5 Hz, aplicando uma

voltagem de 12 V e uma corrente máxima de 5 A. O reator foi operado por 20 minutos, e as microalgas flotadas foram coletadas. Após a realização da eletroflotação não-convencional, 3,6 g de biomassa seca foram obtidos para cada 2,9 L de volume tratado.

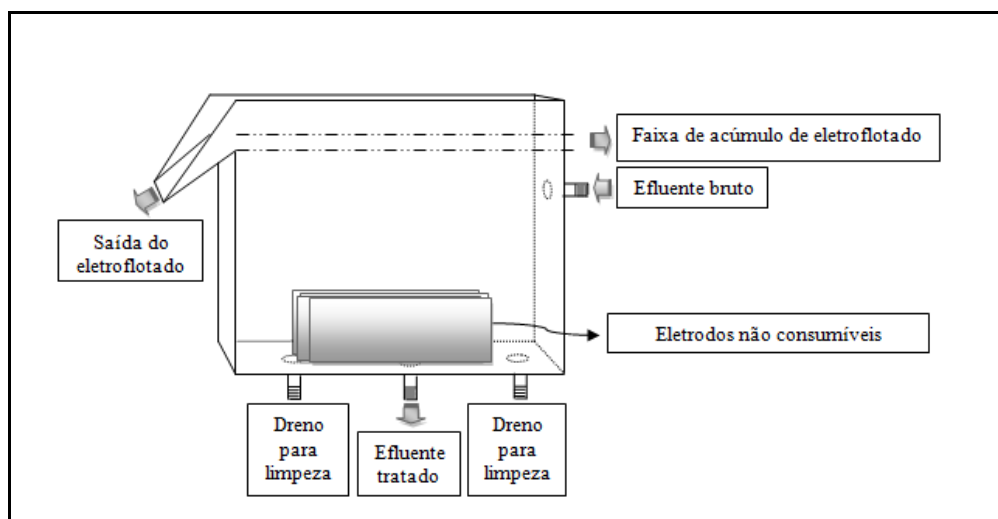


Figura 1 – Reator de eletroflotação não-convencional (EFNC).

O método de pré-tratamento por autoclave foi realizado a 100°C por 10 minutos em um mini-reator (BR-300, Berghof, Alemanha) com 200 mL da amostra. Após esse tempo, o reator foi aberto e as amostras foram expostas à temperatura ambiente.

A liofilização foi realizada após cada pré-tratamento. A biomassa seca (500 mg) foi diluída em 2,5 mL de metanol, 1,25 mL de clorofórmio e 1 mL de água deionizada. A solução foi homogeneizada numa mesa agitadora por 20 minutos. Em seguida, foram acrescentados 1,25 mL de clorofórmio e 1,25 mL de sulfato de sódio 1,5% e a solução foi homogeneizada novamente por 2 minutos.

A amostra homogeneizada foi centrifugada a 1000 rpm por 2 minutos (Excelsa II 206 BL, Famen, Brasil) e o *pellet* formado foi filtrado a vácuo. O filtrado foi levado à estufa a 100°C até atingir peso constante.

Análise dos dados

A eficiência de cada método de pré-tratamento foi determinada com base no rendimento em lipídios que foi calculado pela relação entre a massa dos lipídios totais extraídos e a massa inicial das microalgas. Adicionalmente, a comparação entre os métodos foi realizada com base nas eficiências, na aplicabilidade e no consumo energético de cada um.

Para se verificar as diferenças entre os parâmetros, foi utilizado o software Statgraphics® Centurion XV (StatPoint, EUA). Foram aplicados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis ANOVA e Mann-Whitney. A avaliação foi feita a partir do valor de P, com um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os pré-tratamentos aplicados, exceto para o método de micro-ondas que foi estatisticamente diferente do ultrassom ($p=0,004$) e da autoclave ($p=0,005$). Os métodos de pré-tratamento micro-ondas e eletroflotação não-convencional apresentaram o maior rendimento lipídico, com percentuais de 33,7% e 24,8% ($p=0,15$), respectivamente. Esses métodos foram seguidos pela autoclave (15,4%) e ultrassom (13,3%). O grupo controle alcançou uma eficiência de 4,8%, mostrando-se estatisticamente diferente de todos os métodos avaliados (figura 2).

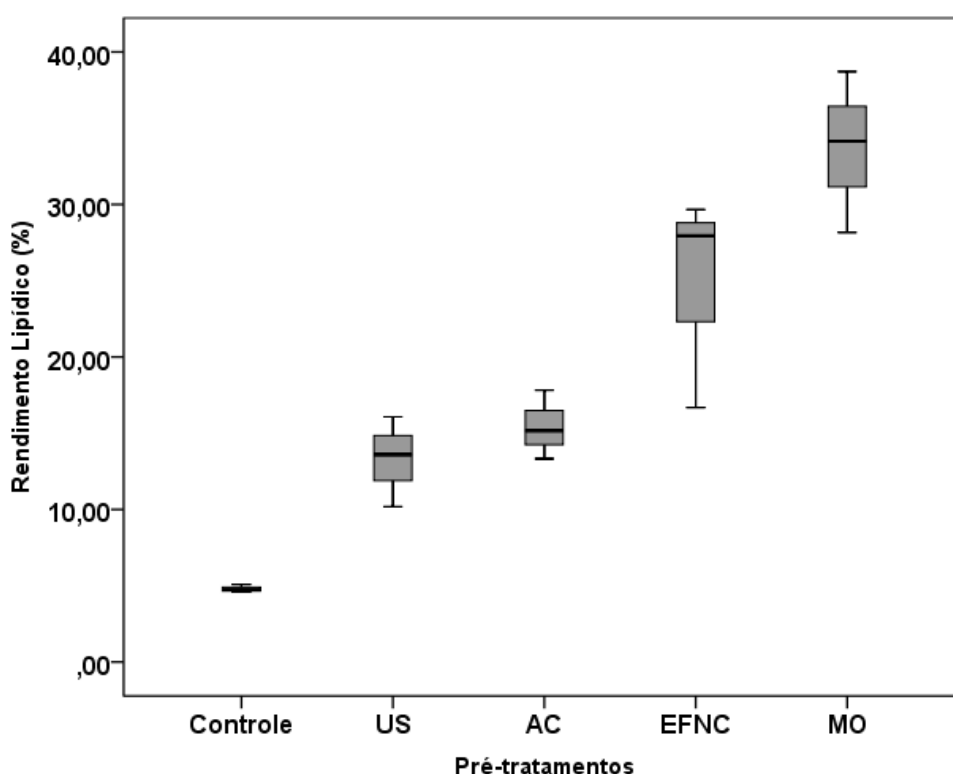


Figura 2 – Rendimento lipídico para os métodos de pré-tratamento testados. C – controle; US – ultrassom; AC – autoclave; EFNC –eletroflotação não-convencional; MO – micro-ondas.

Como neste estudo, outros autores obtiveram melhores rendimentos lipídicos quando utilizaram micro-ondas em comparação com outros métodos de ruptura celular. Koberg *et al.* (2011) compararam a eficiência do micro-ondas e do ultrassom na ruptura celular de microalgas do gênero *Nannochloropsis* com extração simultânea de lipídios pelos solventes metanol e clorofórmio na proporção 1:2 (v/v), utilizando um ultrassonicador com uma frequência de 20 KHz por 5 minutos e um aparelho de micro-ondas operando a 2,45 GHz de frequência por 5 minutos. Os autores alcançaram um rendimento (em biodiesel) de 10,7% no grupo controle, de 18,9% no grupo tratado com ultrassom e de 32,8% no grupo submetido à radiação de micro-ondas. Os autores referem o resultado obtido ao aumento da temperatura que ocorre sob radiação de micro-ondas ser maior que o aumento proporcionado pelo processo de sonicação, o que acarreta a maior ruptura das células e, consequentemente, maior liberação de lipídios para conversão a biodiesel por transesterificação.

Lee *et al.* (2010) compararam cinco métodos de ruptura celular: autoclave (temperatura de 125°C com 1,5 MPa de pressão por 5 minutos); moinhos de esferas (agitador de esferas a 2800 rpm por 5 minutos); micro-ondas (temperatura de 100°C e 2450 MHz por 5 minutos); ultrassom (frequência de 10 KHz por 5 minutos), e o choque osmótico (solução 10% de NaCl agitada por um minuto e em repouso por 48 horas). Os autores observaram que a aplicação de micro-ondas foi o método que apresentou maior simplicidade, facilidade de operação e eficiência na ruptura celular para extração de lipídios das espécies de microalgas *Botryococcus* sp. e *Scenedesmus* sp. Entretanto, Prabakaran e Ravindran (2011) citaram o ultrassom (ressonância de 50 Hz por 15 minutos), como a metodologia mais eficiente de ruptura celular para a extração de lipídios de *Chlorella* quando comparada ao método de micro-ondas (frequência de 2450 MHz a 100°C por 5 minutos).

Wahlen *et al.*, (2011) obtiveram um rendimento lipídico de 14,4%, utilizando ultrassom por 30 segundos e extração de lipídios pelos solventes clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 (v/v), a partir de microalgas coletadas de uma estação de tratamento de esgotos. Este valor é próximo ao obtido neste estudo com o método de extração de lipídios assistida por ultrassom (13,3%), embora os protocolos adotados apresentem diferenças. Ao se realizar a análise de custo energético para os dois métodos que apresentaram os melhores resultados (micro-ondas e eletroflotação não-convencional), pode-se notar que, embora para a eletroflotação não-

convencional tenha sido necessário um tempo de processamento maior que para o micro-ondas, houve um consumo de energia três vezes menor (tabela 1).

Tabela 1: Valores de consumo energético para os métodos de pré-tratamento mais eficientes.

Pré-tratamento	Tempo de operação (s)	Potência (W)	Biomassa pré-tratada (g)	Consumo (Wh g ⁻¹)
Micro-ondas	210	400	1,5	15,5
EFNC	1200	60	3,6	5,6

Para aplicação do método em escala real, é importante considerar algumas questões, como a facilidade de operação e custos de energia (HALIM *et al.*, 2012), o que, no caso da metodologia de micro-ondas, é uma desvantagem em relação ao reator de eletroflotação não-convencional por corrente alternada, considerando que este pode ser facilmente concebido para maiores capacidades, utilizando materiais de baixo custo, como plástico, acrílico, aço, concreto.

Outro fator importante a ser considerado na produção de biodiesel a partir de microalgas é o custo com o cultivo, uma vez que existe um elevado consumo de energia e custos de funcionamento, devido à necessidade de fontes de luz artificiais em sistemas controlados (CHEN *et al.*, 2011). Neste estudo, foi possível extrair quantidades elevadas de lipídios a partir da biomassa produzida com custos extremamente baixos em lagoas de estabilização tratando esgoto sanitário.

CONCLUSÕES

Todos os métodos de pré-tratamento analisados foram aplicáveis à biomassa de microalgas provenientes de lagoas de estabilização, mostrando a eficiência de extração de lipídios significativamente mais elevada que o grupo controle. Deve-se enfatizar que as técnicas de micro-ondas e eletroflotação não-convencional alcançaram os melhores resultados e não apresentaram diferença estatística.

No entanto, quando os custos de energia foram considerados, a eletroflotação não-convencional superou todos os outros métodos, mostrando-se uma alternativa promissora para a ruptura das células de microalgas produzidas tanto em lagoas abertas, como em fotobiorreatores.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE), pelo financiamento da pesquisa e/ou bolsas de estudos. Gostaríamos também de agradecer à EMBRAPA Agroindústria Tropical pela realização da liofilização das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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, p. 911-917, 1959.
2. BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 9, 1999.
3. CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.
4. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
5. HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.
6. KITA, K.; OKADA, S.; SEKINO, H.; IMOU, K.; YOKOYAMA, S.; AMANO, T. Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery. *Applied Energy*, v. 87, n. 7, p. 2420-2423, 2010.

7. KOBERG, M.; COHEN, M.; BEN-AMOTZ, A.; GEDANKEN, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 5, p. 4265-4269, 2011.
8. LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, p. S75-77, 2010.
9. MENDES, A. P. A.; COSTA, R.C. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. *Biocombustíveis*, v. 31, p. 28, 2010.
10. PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 150-154, 2011.
11. PITTMAN, J.K.; DEAN, A.P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 17-25, 2011.
12. RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, 2011.
13. SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.
14. 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. 2724-2730, 2011.