

EXTRAÇÃO DE LÍPIDEOS DE CIANOBACTÉRIAS (*Microcystis protocystis*) ASSISTIDA POR PRESSURIZAÇÃO CÍCLICA

G. A. S. SUREK¹, G. BATISTA¹, F. P. CAMACHO², C. BENINCÁ³, R. BERGAMASCO², L. CARDOZO-FILHO², E. F. ZANOELO^{1*}

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Química

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química

³Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e de Alimentos

*e-mail: everton.zanoelo@ufpr.br

RESUMO

Cianobactérias da espécie *Microcystis protocystis* foram cultivadas em laboratório e posteriormente desidratadas. O material resultante foi submetido a uma operação de extração de lipídeos assistida por ciclos de compressão hidrostática. A remoção de lipídeos da matriz sólida ocorreu em extrator batelada, empregando etanol como solvente, a temperatura de 30°C e pressurização cíclica de 400 kPa. Ciclos de pressurização hidrostática e decompressão do sistema para a pressão atmosférica, com duração de 300 s cada, foram adotados durante o período de extração de 21600 s. Alíquotas foram removidas da fase líquida em intervalos de 1800 ou 3600 s, e a massa resultante de extrato foi determinada por evaporação do solvente. Um ensaio de extração exaustiva em Soxhlet foi conduzido por 12 h na temperatura de ebulição do etanol e a uma razão sólido-solvente de $\approx 1:60$ (em massa). Um rendimento de extrato no equilíbrio da ordem de 13% foi estimado por um modelo cinético de 1ª ordem para a extração com ciclos de pressão hidrostática. Com base no percentual de soluto por extração com Soxhlet (22,5%), a técnica investigada apresentou uma eficiência de extração próxima a 56%.

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias do gênero *Microcystis* apresentam grande floração natural em ambientes aquáticos no Brasil. Como são responsáveis pela produção da cianotoxina microcistina geram um sério risco a flora e fauna, com casos de intoxicação documentados (CAMACHO et al., 2012).

A presença cada vez mais recorrente destas e outras cianobactérias tóxicas em corpos aquáticos utilizados como fonte de água de abastecimento tem gerado interesse em entender o aumento das florações (WU et al., 2015), e propor tecnologias de remoção destes sólidos de águas de abastecimento

(HOEGER; HITZFELD; DIETRICH, 2005). Neste sentido, processos de separação sólido-líquido com agentes floculantes alternativos aos empregados comercialmente, e processos de separação por membranas tem sido testados com relativo sucesso, por exemplo (CAMACHO et al., 2012).

Entretanto, o destino do lodo, oriundo desta operação conduzida em larga escala, constitui um problema não menos grave do que a própria remoção das cianobactérias da água. Como as cianobactérias são ricas em lipídeos, pesquisadores tem estudado a viabilidade de utilização deste tipo de biomassa para produção de biodiesel (DA RÓS et al., 2013; SINGH et al., 2015). No

entanto, assim como ocorre com a produção de biodiesel a partir de microalgas, um dos principais gargalos do processo é o baixo rendimento da etapa de extração de lipídeos (MENÉNDEZ et al., 2014; SOARES et al., 2014).

Dentre as diferentes técnicas modernas de extração sólido-líquido reportadas na literatura (ex.: extração assistida por ultrassom, por microondas, por campos elétricos pulsados, com líquido pressurizado e com fluidos supercríticos) (MENÉNDEZ et al., 2014; KOTOVICZ; WYPYCH; ZANOELO, 2014) uma alternativa econômica em termos de custo de capital, tempo e rendimento de extrato é a extração com ciclos ou pulsos de compressão/descompressão hidrostática (NAVIGLIO et al., 2008; KOTOVICZ; ZANOELO, 2013; ORTIZ; BENINCÁ; ZANOELO, 2015).

Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho é avaliar a cinética de extração de lipídeos de lodos desidratados de cianobactérias da espécie *Microcystis protocystis* em uma condição particular de extração, assistida por pressurização cíclica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As cianobactérias utilizadas como fonte de lipídeos nesta investigação são da espécie *Microcystis protocystis*. Em particular, são cianobactérias cultivadas a partir da cepa HBRF01 (fornecida pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais, COPASA/MG) em condições reportadas detalhadamente na literatura (CAMACHO et al., 2012). A biomassa resultante foi submetida à uma operação de separação do meio aquoso de cultivo e à posterior secagem em estufa a 60°C. O lodo desidratado foi classificado granulometricamente em agitador mecânico com peneiras da série Tyler (10, 12, 14, 24, 28, 80, 170, 200, 270 e 325 mesh) e armazenado para emprego nos ensaios de extração.

De maneira preliminar aos ensaios de remoção de lipídeos, amostras do lodo tiveram sua umidade determinada por gravimetria. O procedimento demandou uma estufa, mantida com o lodo a 55°C por 24 h, e uma balança analítica com resolução de 0,0001 g. Em seguida, amostras do mesmo material com massas de $0,3004 \pm 0,0004$ g foram acondicionadas em sachês de papel-filtro com tamanho de poros de 14 μ m. Os leitos empacotados foram individualmente transferidos para diferentes câmaras de extração contendo $2,356 \pm 0,003$ g de etanol (pureza $\geq 99,8\%$) a 30°C. A escolha de etanol como solvente foi principalmente motivada pelo seu baixo custo, alta pressão de vapor e baixa toxicidade. Os dois últimos atributos permitem a fácil remoção do solvente residual do óleo extraído e a eventual utilização da lama sólida para alimentação animal. A natureza polar do etanol pode ser interpretada como um aspecto negativo, mas isto permite a quebra de certas ligações entre lipídeos e proteínas que tornam possível a extração de uma fração particular de lipídeos neutros (SOARES et al., 2014).

As câmaras de polietileno com formato cilíndrico e de volume próximo a 5 mL eram fechadas em uma das extremidades e dotadas de um êmbolo removível na extremidade oposta. Após a alimentação da mistura sólido-líquido, o sistema era pressurizado, com auxílio de uma prensa hidráulica, por deslocamento do êmbolo até uma certa posição definida pela lei de Boyle, necessária para obtenção da pressão desejada (≈ 400 kPa). Uma frequência de 1:600 ciclos de compressão por segundo foi adotada (i.e.; o sistema foi mantido pressurizado por 300 s e a pressão atmosférica por 300 s adicionais em cada ciclo). As câmaras permaneceram em banho ultratermostático a 30°C durante todo o período de extração.

Embora os experimentos de extração assistida por pressurização cíclica tenham sido conduzidos em uma única condição de

operação, o propósito de utilizar mais de uma câmara de extração foi evitar a redução excessiva de solvente da câmara de extração durante o processo de amostragem da fase líquida, o que alteraria significativamente a razão sólido-solvente inicial. Desta forma, a primeira câmara operou por 3600 s com retirada de duas alíquotas de $\approx 0,7$ mL no final do tempo de operação, e uma possível alíquota de $\approx 0,3$ mL a 1800 s (Δt). De maneira análoga, a segunda câmara operou por 7200 s com remoção de duas alíquotas da fase líquida de $\approx 0,7$ mL no final do tempo de operação, e uma possível alíquota de $\approx 0,3$ mL a 7200- Δt s (isto é a 5400 s). No total 06 câmaras foram empregadas.

As alíquotas foram levadas a uma estufa, onde permaneceram até peso constante para remoção do solvente e determinação da massa de extrato na alíquota. As massas de extrato nos diferentes tempos permitiram a estimativa da fração mássica de soluto na fase líquida e a construção da curva cinética de extração (*y versus t*). O método gravimétrico em questão permite a determinação de solutos totais e foi essencialmente adotado devido a sua simplicidade em comparação a técnicas mais refinadas que possibilitam a estimativa precisa da fração de lipídeos e o perfil químico dos mesmos, como por exemplo a cromatografia.

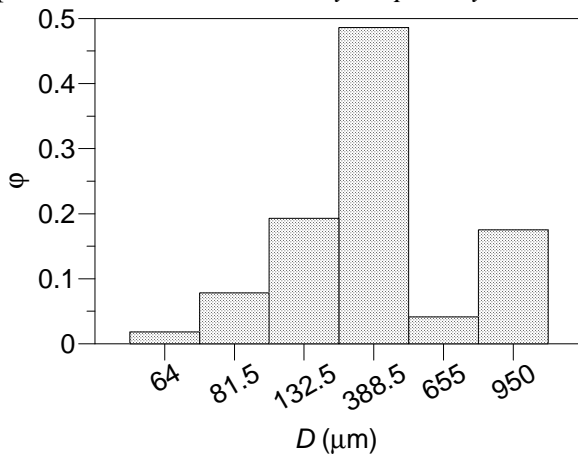
Um ensaio único de extração em Soxhlet foi conduzido a fim de determinar a eficiência do método de extração assistida por pressurização cíclica. Neste sentido, parte-se da premissa que a extração em Soxhlet é responsável pela extração de todo o lipídeo encontrado na matriz sólida. A extração ocorreu na temperatura de ebulição do solvente a pressão atmosférica, e a uma razão sólido-solvente igual a 1:60 em massa (a fim de garantir que não haveria saturação da solução líquida) durante um intervalo de 12 h.

O lodo de cianobactérias empregado nos ensaios de extração apresentou uma umidade de aproximadamente 7,82% em base úmida. Este valor indica que apesar da etapa de secagem adotada após o cultivo das cianobactérias em meio aquoso, que gerou um produto com umidades residuais, o longo período de armazenamento do material foi responsável pelo incremento da umidade até a umidade de equilíbrio em condições ambiente de temperatura e umidade relativa. Este valor é significativamente alto se comparado aos teores de lipídeos extraídos que serão apresentados na sequência. Sendo assim, se não computado, ocasionaria uma subestimativa do rendimento de lipídeos determinado por método gravimétrico. Também cabe destacar que em geral a umidade tem um efeito negativo sobre o rendimento de extratos, logo em uma situação ótima de extração a umidade da matriz sólida em questão deveria ser reduzida ao mínimo valor possível (JOHNSON, 2000).

A Figura 1 apresenta a distribuição granulométrica do lodo de cianobactérias. Ressalta-se de imediato que dentre as 10 peneiras empregadas somente em 6 destas houve retenção significativa de massa de sólido. Deste modo pode-se afirmar que o lodo apresenta tamanho médio de partículas superior a 64 μm e inferior a 950 μm , com $\approx 50\%$ de massa de diâmetro médio aproximadamente igual a 388,5 μm . Um resultado adicional extremamente relevante reportado na Figura 1 é que a fração de material de menor diâmetro médio apresenta um tamanho aproximadamente 4,5 (i.e.; 64/14) vezes maior do que o tamanho dos poros dos sachês empregados para empacotamento das cianobactérias. Isto reduz a possibilidade de erros na determinação de massa de extrato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

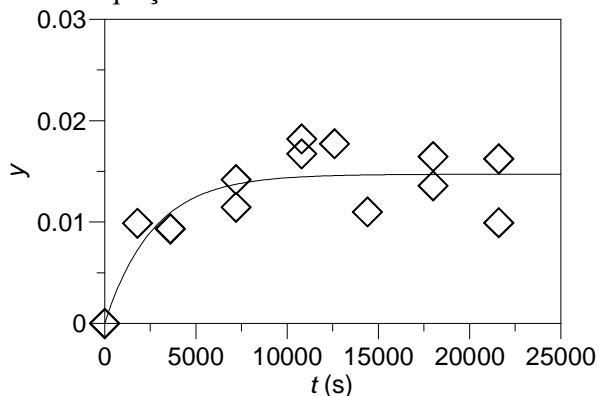
Figura 1 – Distribuição de tamanho de partículas do lodo de *Microcystis protocystis*.



A curva cinética de extração assistida por pressurização cíclica a aproximadamente 400 kPa é observada na Figura 2.

Os dados da Figura 2 reportam a fração mássica de soluto na fase líquida em função do tempo de extração. Como esperado, um modelo de primeira ordem (Equação 1) descreveu corretamente os resultados experimentais.

Figura 2 – Fração mássica de solutos na fase líquida em função do tempo de extração. Símbolos: resultados experimentais; linha sólida: Equação 1.



O desvio médio relativo entre resultados experimentais e calculados na Figura 2 é da ordem de 20%. Este valor relativamente alto, o qual não é estranho se observada a grande dispersão dos pontos na Figura 2, é essencialmente atribuído a incertezas

experimentais que não puderam ser reduzidas por repetição das provas devido a disponibilidade limitada das cianobactérias.

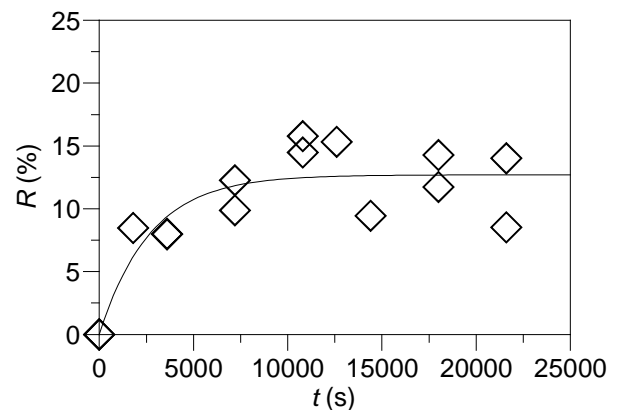
Os parâmetros ajustáveis do modelo em questão (Equação 1) foram estimados pelo método de otimização de Levenberg-Marquardt de forma a minimizar o somatório do quadrado dos resíduos.

$$y = 1,47 \times 10^{-2} [1 - \exp(-3,76 \times 10^{-4} t)] \quad (1)$$

A partir dos dados da Figura 2 e empregando a Equação 2 constrói-se rapidamente a curva cinética de rendimento de extrato (Figura 3).

$$R = 100 \left[\frac{m_s}{m_c(1-U)} \right] \left(\frac{y}{1-y} \right) \quad (2)$$

Figura 3 – Curva Cinética de rendimento de extrato. Símbolos: Equação 2 com y experimental; linha sólida: Equação 2 com y calculado.



Substituindo-se na Equação 2 os valores médios de massa de solvente, massa de cianobactérias e umidade em base úmida (reportados na secção anterior) e considerando a fração mássica de soluto no equilíbrio dada pela Equação 1 (0,0147) estima-se que o rendimento de extrato no equilíbrio foi aproximadamente igual a 12,7%. Este valor dividido pelo rendimento em Soxhlet com etanol ($\approx 22,5\%$) resulta em

uma eficiência de extração assistida por pressurização cíclica da ordem de 56%.

Um valor de rendimento igual a 29,6% de lipídeos foi obtido com a mesma cepa de *Microcystis protocystis* em uma razão sólido-solvente análoga à utilizada no presente experimento (CAMACHO et al., 2015). Entretanto, este resultado foi alcançado a uma temperatura de extração de 60°C, o que impacta positivamente o rendimento no equilíbrio. Sabe-se que a natureza dos lipídeos encontrados em diferentes microalgas e cianobactérias faz com que os solutos apresentem solubilidades diferentes em distintos solventes. Neste sentido, é possível atribuir esta discrepância em termos de rendimento, ao menos parcialmente, ao fato do referido resultado reportado na literatura ter sido obtido com hexano. De fato, o menor rendimento de extração em aparelho de Soxhlet com etanol, da ordem de 22,5%, confirma o efeito significativo do tipo de solvente.

4 CONCLUSÕES

Os resultados preliminares obtidos nesta investigação não permitem verificar o impacto dos ciclos de pressurização sobre a cinética de extração e rendimento de equilíbrio. Entretanto, considerando-se o percentual de extrato obtido no equilíbrio ($\approx 13\%$) e o potencial de otimização da extração por utilização de outros solventes, temperaturas e pressões superiores, acredita-se que a técnica de extração investigada é promissora para propósitos de extração de lipídeos totais de cianobactérias. A eficiência alcançada pelo método ($\approx 56\%$) em uma condição não ideal de extração corrobora esta afirmação.

NOMENCLATURA

D diâmetro médio das partículas retidas nas diferentes peneiras da série Tyler;

m_s massa de solvente alimentada na câmara de extração (kg);

m_c massa de cianobactérias alimentada na câmara de extração (kg);

R rendimento de extrato (massa de extrato por massa de lodo seco) (%);

t tempo de extração (s);

U umidade do lodo em base úmida e em decimal (kg kg^{-1});

y fração mássica de soluto na fase líquida (kg kg^{-1});

ϕ fração mássica de cianobactérias retida nas diferentes peneiras da série Tyler.

REFERÊNCIAS

CAMACHO, F. P., STROHER, A. P., MORETI, L., SILVA, F. A., WURZLER, G. T., NISHI, L., BERGAMASCO, R. Remoção de cianobactérias e cianotoxinas em águas de abastecimento pela associação de flotação por ar dissolvido e nanofiltração. **e-xacta**, v.5, p.127-138, 2012.

CAMACHO, F. P., BONGIOVANI, M. C., NISHI, L., REZENDE, D., SILVA, M. F., BERGAMASCO, R. Valuation of the seed extract *Moringa oleifera* for removal of cells microcystis Sp. Enabling the production of Biodiesel. **Chemical Engineering Transactions**, v.43, p.1-6, 2015.

DA RÓS, P. C. M., SILVA, C. S. P., SILVA-STENICO, M. E., FIORE, M. F., DE CASTRO, H. F. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. **Marine Drugs**, v.11, p.2365-2381, 2013.

HOEGER, S. J., HITZFELD, B. C., DIETRICH, D. R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, p.231-242, 2005.

JOHNSON, L. A. Recovery of fats and oils from plant and animal sources. In: Introduction to fats and oils technology, 2000 Champaign, IL, AOCS Press, p.108-135.

KOTOVICZ, V., WYPYCH, F., ZANOELO, E. F. Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v.132C, p.1-9, 2014.

KOTOVICZ, V., ZANOELO, E. F. Hydrostatic Pressure Cycling Extraction of Soluble Matter from Mate Leaves. **Journal of Food Engineering**, v.116, p.656-665, 2013.

MENÉNDEZ, J. M. B., ARENILLAS, A., DÍAZ, J. A. M., BOFFA, L., MANTEGNA, S., BINELLO, A., CRAVOTTO, G. Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, p.1779-1784, 2014.

NAVIGLIO, D., CARUSO, T., IANNECE, P., ARAGÓN, A., SANTINI, A. Characterization of high purity lycopene from tomato wastes using a new pressurized extraction approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.6227-6231, 2008.

ORTIZ, R. W. P., BENINCÁ, C., ZANOELO, E. F. Cyclically pressurized extraction of solutes from ground coffee: kinetic experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v.141, p.256-262, 2015.

SINGH, J., SINGH, M. K., KUMAR, M., THAKUR, I. S. Immobilized lipase from *Schizophyllum commune* ISTL04 for the production of fatty acids methyl esters from

cyanobacterial oil. **Bioresource Technology**, v.188, p.214-218, 2015.

SOARES, A. T., DA COSTA, D. C., SILVA, B. F., LOPES, R. G., DERNER, R. B., ANTONIOSI FILHO, N. R. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. **Bioenergy Resources**, v.7, p.1035-1044, 2014.

WU, T., QIN, B., BROOKES, J. D., SHI, K., ZHU, G., ZHU, M., YAN, W., WANG, Z. The influence of changes in wind patterns on the areal extension of surface cyanobacterial blooms in a large shallow lake in China. **Science of the Total Environment**, v.518-519, p.24-30, 2015.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao MEC/FNDE pela bolsa de iniciação científica para G. A. S. SUREK e à CAPES pela bolsa de mestrado para G. BATISTA.