

6º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

ESTUDO COMPARATIVO DO TEOR E PERFIL LIPÍDICO DO ÓLEO DA *Synechosystis sp2*
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

AUTORES:

LUANNA C. M. PAIVA, CAMILA C. ALMEIDA, MARTA COSTA, ANDERSON F. GOMES,
CARLOS R. SOUTO

INSTITUIÇÃO:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 09 a 13 de outubro de 2011, em Florianópolis-SC. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 6ºPDPETRO.

ESTUDO COMPARATIVO DO TEOR E PERFIL LIPÍDICO DO ÓLEO DA *Synechosystis sp2* VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Abstract

Given the need for new energy sources, microalgae appear as a promising source of oil for biodiesel production. These exceed crop land in productivity in oil, eliminating fertile land for cultivation. This paper describes the preliminary results extraction by solvent of lipids from the cyanobacterium *Synechosystis sp2*, to evaluate the oil content and lipid present. The extractions were performed in different ways, using *n*-hexane through incubation method and the Bligh & Dyer (methanol / chloroform / water) in two ways, traditional procedure and with the aid of ultrasound and hatchery to mitigate the disruption of cell microalgae. Moisture content by gravimetric test was important be used to optimize the real income of the lipid fraction extracted from the dry biomass. The more yield obtained by lipid from *Synechosystis sp2*, from the methods employed in the study, were verified by Bligh & Dyer accompanied by ultrasonic bath with 5.62% oil yield. However, the pure aspect of oil was observed in *n*-hexane method through incubation with 1.00% oil yield. The results of thin layer chromatography (TLC) using silica gel plates and mobile phase, hexane / ethyl acetate (9:1) suggests that, after development with iodine sublimed, the separation of a mixture of components with different retention rates (*R_f*). Data from spectroscopy (FT-IR and UV-vis.) show characteristic groups similar to those of vegetable oils, suggesting careful studies of potential *Synechosystis sp2* from oil in order to produce biodiesel.

Keywords: Microalgae, *Synechosystis sp2*, evaluation of oil, biodiesel.

1. Introdução

Microalgas são organismos que crescem rapidamente em diferentes ambientes aquáticos (água doce, marinha, reciclada, etc) captando energia luminosa para converter dióxido de carbono e água em biomassa, constituída por proteínas, carboidratos e lipídeos. São, portanto, absorvedoras de CO₂ e potenciais fontes de biocombustíveis, principalmente biodiesel (produzido por transesterificação de triglicerídeos). A produção desses tem sido apontada como um dos grandes desafios tecnológicos do século XXI e seu emprego, de forma sustentável, depende, contudo, da proposição de matérias-primas que não façam parte da cadeia alimentar humana e da produção de ração animal, para que não haja competição entre alimentos e combustíveis.

Devido ao seu alto teor de lipídios, as microalgas constituem uma das mais promissoras fontes de biomassa. Em laboratório, superam a produtividade dos grãos de oleaginosas, produzindo óleo dez vezes mais que o dendê, considerada uma das oleaginosas mais ricas, com produção de 4.400 quilos por hectare. Seu cultivo não depende de solo fértil e pode ser realizado sobre áreas secas, pois demandam menos água para manutenção do que as irrigações das lavouras (REYNOL, 2008).

As informações sobre o cultivo de microalgas visando à obtenção de combustíveis ainda são escassas e baseadas, na maioria dos casos, em extrapolações (TEIXEIRA & MORALES, 2006). São necessários, ainda, muitos estudos de laboratório sobre sua produtividade, que pode duplicar, de biomassa, em 24h (MENG *et al.*, 2008). Seu óleo tem características físico-químicas semelhantes aos dos óleos vegetais e verifica-se que, em ambientes com deficiência de nutrientes, este conteúdo aumenta. O entendimento das condições que influenciam o perfil e elevam o teor lipídico é primordial para tornar economicamente viável a produção de biodiesel a partir de microalgas.

Nosso laboratório vem desenvolvendo estudos, em escala de laboratório, com microalgas nativas de nossa região. Investigando, seu crescimento, produção, extração e características físico-químicas do óleo/biodiesel. Este trabalho descreve os resultados preliminares com a cianobactéria *Synechosystis sp2*, espécie mundialmente investigada nos processos de metabolismo de carbono, respiração, fotossíntese, análises de carotenóides e clorofila (ARIZONA STATE UNIVERSITY, 2011). Sua adaptação, em território Norte Rio-Grandense (Fazenda Samisa em Extremoz), é objeto de estudo do Projeto “Implementação de um planta piloto para produção de biomassa de microalgas, visando à obtenção de biodiesel”, parceria da Petrobras/CENPES-UFRN. Os resultados do teor em óleo extraídos por sonicação e agitação orbital com solventes de diferentes polaridades são aqui relatados. Análise espectrofotométrica UV-Vis e Infravermelho médio (FTIR), assim como cromatografia em camada delgada também foram efetuadas visando correlacionar o perfil lipídico com sua composição.

2. Metodologia

2.1. Cultivo da espécie

A espécie *Synechosystis sp2* foi cultivada em água estuarina com adição de NPK 5% para o seu crescimento. A fim de pré-concentrar as células da microalga em questão, foi utilizado um floculante e, em seguida, exposto a iluminação natural para secagem da umidade residual.

2.2. Extração do óleo

Para a análise do teor lipídico da microalga *Synechosystis sp2* foram submetidos dois processos de extração com solvente, utilizando solventes como: *n*- hexano (menor polaridade) e a mistura de solventes metanol/clorofórmio/água (maior polaridade). A extração dos lipídeos neutros e totais presentes na espécie foram realizados a partir do método Bligh & Dyer tradicional e, ainda, com uso de equipamentos como ultrassom e incubadora de agitação orbital para auxiliar no rompimento celular do microorganismo. A biomassa seca foi fornecida em aspecto de flocos, sendo necessária a maceração do material a fim de aumentar a superfície de contato entre a biomassa e o solvente extrator.

2.2.1. Método Bligh & Dyer

Foram utilizados o método tradicional e o modificado, sendo o último com atenuado rompimento celular através do ultrassom e incubadora. Para o método Bligh & Dyer tradicional (BLIGH *et al.*,1959) foi utilizada uma amostra de 500 mg da biomassa seca da espécie, 4 mL de solvente metanol e clorofórmio cada, 3,6 mL de água destilada, solubilizados com o auxílio de agitador magnético sem temperatura e, por fim, submetido a uma centrifugação (modelo SIGMA 6-15, da SIGMA LABORZENTRIFUGEN) de 2000 rpm por 10 min., para obter um sistema trifásico. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi retirada a fração mais densa do sistema trifásico (clorofórmio + óleo) e transferida para um balão volumétrico previamente pesado, o qual foi levado ao rotaevaporador (60 °C) para evaporação do solvente extrator e calculado o rendimento dos lipídeos totais.

No método Bligh & Dyer modificado, foram preparadas duas amostras de 500 mg da biomassa seca e em cada uma delas adicionados 4 mL de solvente metanol, 4 mL de clorofórmio e 3,6 mL de água destilada. Das amostras extraídas, uma foi realizada através de um banho ultrassônico (frequência 40 kHz, temporizador digital de 0-30 min., potência de 120 Watts, modelo USC 1600, da UNIQUE), por 20 min., e a outra em incubadora de agitação orbital (modelo Q816M21, da QUIMIS) com duração de 20 min. e temperatura controlada em 60 °C. Decorrido esse tempo, as duas amostras foram submetidas à centrifugação (modelo SIGMA 6-15, da SIGMA LABORZENTRIFUGEN) de 2000 rpm por 2 min., para obter um sistema trifásico. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi

retirada a fração mais densa do sistema trifásico (clorofórmio + óleo) e transferida para um balão previamente pesado, cujo solvente foi removido em rotaevaporador (60 °C).

2.2.2. Extração *n*- hexano

A extração por solvente foi realizada a partir de uma incubadora de agitação orbital (modelo Q816M21, da QUIMIS), utilizando amostras de 500 mg da biomassa seca, 50 mL de *n*- hexano, com duração de 8h de extração e temperatura controlada em 60 °C. Após filtração, o extrato foi secado com sulfato de sódio anidro e, novamente, filtrado em um balão de fundo redondo. O solvente foi removido em rotaevaporador, cujo banho foi mantido a 60 °C. O cálculo de rendimento (%) lipídico foi realizado baseado nos pesos, da biomassa seca (m_i) e do óleo (m_o), onde $\% \text{ óleo} = 100 m_o/m_i$. O fluxograma (Figura 1) ilustra o processo de extração dos lipídeos.

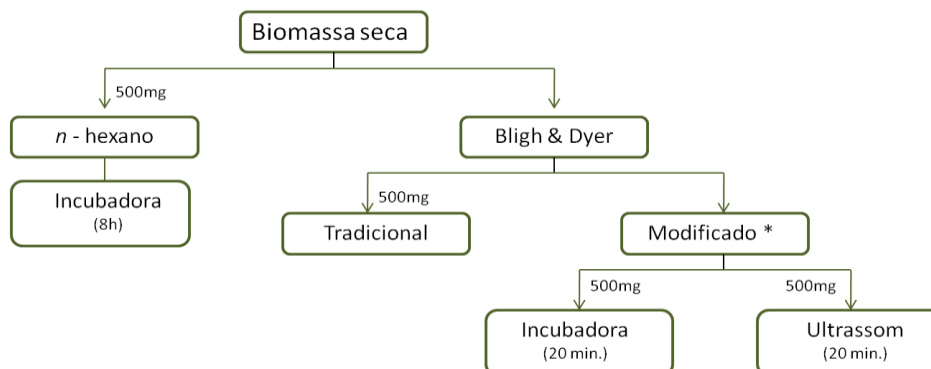


Figura 1- Fluxograma do processo de extração dos lipídeos para a espécie *Synechosystis sp2*.

*Extração Bligh & Dyer seguida de rompimento celular através de Incubadora e/ou Ultrassom.

2.3. Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado por análise gravimétrica (SKOOG *et al.*, 2009) aquecendo-se a biomassa (*Synechosystis sp2*), em estufa, a 100 – 110°C, até que seu peso se mantenha inalterado. Calcula-se, através da fórmula, $\% \text{ de água} = 100 (bu-bs)/bu$, que representam, em gramas, a biomassa úmida (bm) e a seca (bs).

2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para análise por Cromatografia em Camada delgada (CCD), com auxílio de capilar de vidro, foram aplicados os *spots* dos extratos previamente secados com sulfato de sódio, sobre cromatoplaças de sílica gel 60, com indicador de fluorescência a UV₂₅₄, adsorvidas em alumínio. Após eluição com a fase móvel, hexano/acetato de etila (9:1), os *spots* foram revelados com vapores de iodo sublimado.

2.5. Análise por espectroscopia do UV-Vis.

As análises de UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro evolution 60 da Thermo Scientific, através da dissolução de aproximadamente 0,05 mL de óleo em 3 mL no solvente (usado como extrator e como branco nessa análise). Foi realizada uma varredura de 200 à 800nm, com intervalos de 1nm e medidas de absorbância de 0-10A, de 0,1A. Em seguida, como o auxílio do software VisionNite, foi plotado o gráfico do comprimento de onda (λ , nm) x Absorbância (A).

2.6. Análise por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

A análise por FTIR, na faixa de 600 – 4000 cm^{-1} foi realizada em um espectrofotômetro JASCO, modelo FT/IR- 4200, com resolução máxima 0,5 cm^{-1} , S/N 30 000:1, através da dissolução do óleo em diclorometano e, posterior, deposição do filme fino em pastilhas de KBr.

3. Resultados e Discussão

3.1. Comparação dos solventes extratores

Neste estudo, a determinação de lipídeos da *Synechosystis sp2* foi realizada por sonicação e agitação orbital, com solventes de diferentes polaridades, *n*-hexano e mistura metanol/clorofórmio/água. Dessa forma, avaliou-se a correlação capacidade de extração dos solventes em função do perfil lipídico. A Tabela 1 resume os resultados dos diferentes procedimentos.

De acordo com os dados, a fração lipídica obtida pela mistura de solvente metanol/clorofórmio/água (Bligh & Dyer) por banho ultrassônico foi a que apresentou maior rendimento, de 5,62 %, dentre os métodos empregados neste trabalho. Observa-se, contudo, que a de aspecto visual mais límpido foi *n*-hexano via incubadora (Tabela 1), indicando a ausência (ou presença em quantidade mínima) de pigmentos (carotenóides e clorofilados). Por essas características, foi adotada a fração resultante do *n*-hexano para avaliação do conteúdo em óleo e o perfil lipídico presentes na *Synechosystis sp2*.

Tabela 1- Aspectos gerais dos lipídeos obtidos.

Aspectos Gerais	<i>Synechosystis sp2</i>			
	<i>n</i> - hexano Incubadora (8h)	Bligh & Dyer		
		Tradicional	Modificado	
			Incubadora (20 min.)	Ultrassom (20 min.)
Rendimento (%)	1,00 *	3,62 *	2,25 *	5,62 *
Aparência de pigmento clorofila	-	+	+	+
Particularidades	Óleo escuro	Óleo escuro	Óleo escuro	Óleo escuro

(-) Ausência, (+) presença atenuada.

*Rendimentos calculados a partir da biomassa seca, determinados pelo teor de umidade.

3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A partir da análise por CCD, qualitativamente, foi verificada a presença dos constituintes majoritários, como os lipídios neutros - triglicerídeos e ácidos graxos, bem como o aparecimento dos lipídeos polares-fosfolipídeos (Figura 2 e Tabela 2). O fosfolipídio, por ser um lipídio polar, sofre pouca influência da fase móvel utilizada (hexano/acetato de etila- 9:1), ficando retido na origem, ou seja, no split.

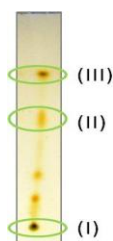


Tabela 2- Componentes das frações.

Compostos	Padrões (R _f s)*	<i>Synechosystis sp2</i>
		<i>n</i> - hexano via incubadora (8h)
Triglicerídeos (III)	0,54	0,70
Ácidos graxos (II)	0,42	0,49
Fosfolipídeos (I)	0,0	0,00

Figura 2- CCD

*Padrões de lipídeos (BRUM *et al.*, 2009)

3.3. Análise por espectroscopia do UV-Vis e Infravermelho Médio (FT-IR)

A análise espectrofotométrica na região do ultravioleta fornece informações sobre a qualidade do óleo e revela seu perfil graxo. De acordo com a literatura, devido às ligações duplas isoladas carbono-carbono presentes nos ácidos graxos, os triglicerídeos são observados em 210 nm (REDA, 2004). Ácidos graxos conjugados (dienos e trienos conjugados) mostram intensa absorção na região de 230 a 270 nm (TOLENTINO, 2008) enquanto que os pigmentos estão na faixa de 350 a 550 nm (OGAWA *et al.*, 2007; MORETTO & FETT, 1998). A identificação da clorofila *a*, presente em algas e plantas superiores, pode ser confirmada pela presença da absorção em 420 e 660 nm enquanto carotenóides absorvem de 460 a 550 nm (ICB. UFMG, 2011). Na Figura 3 observa-se que as maiores absorções foram verificadas em 212-213 nm, nos extratos de *n*- hexano e Bligh & Dyer,

respectivamente. Isto sugere que o óleo é constituído predominantemente por triglicerídeos. Entre 236 e 237 nm, observa-se as absorções dos ácidos graxos com insaturações conjugadas. Adicionalmente, pequenas absorbâncias foram observadas na região característica de pigmentos, especialmente nos comprimentos 479 nm (fração *n*-hexano), sugerindo a presença do pigmento apolar, carotenóide, e em 420 nm (fração Bligh & Dyer), característico de pigmento mais polar (clorofila *a*).

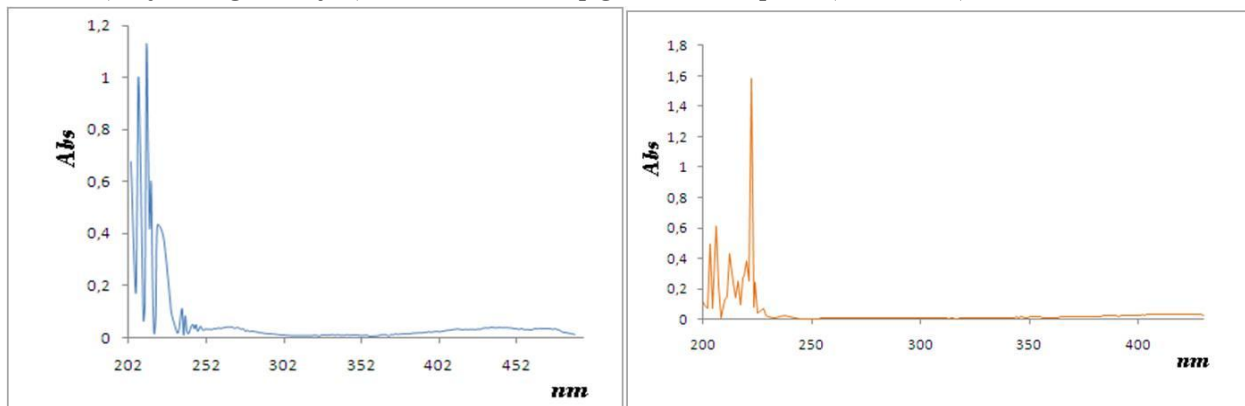


Figura 3- Espectros de UV-vis da *Synechosystis sp2* do extrato com *n*-hexano (incubadora) e Bligh & Dyer modificado (MeOH/CHCl₃/H₂O, ultrassom), respectivamente.

Os dados por infravermelho indicam a presença de triglicerídeos na fração obtida pela extração *n*-hexano. Isto se deve principalmente pelas absorções características de ésteres (Figura 4), verificadas pelas bandas deformação axial da ligação dupla C=O, em 1741 cm⁻¹ (4), e deformação angular de C-C(=O)-O e C-O entre 1242 e 1173 cm⁻¹ (6), onde a última mostra essa confirmação. As demais absorções mostram a presença de cadeias hidrocarbônicas longas, deformação axial da ligação H-C (saturado) entre 2922-2853 cm⁻¹ (3), deformação angular CH de alceno em 1460 cm⁻¹ (5) e deformação angular C-H em 722 cm⁻¹ (7) e, ainda, o aparecimento de insaturações pela deformação axial da ligação C=C-H de alcenos em 3012 cm⁻¹ (2). A presença de uma absorção larga entre 2500-3300 cm⁻¹ (1) indica que a presença de umidade, embora não exclua a possibilidade de remoção de compostos hidroxilados.

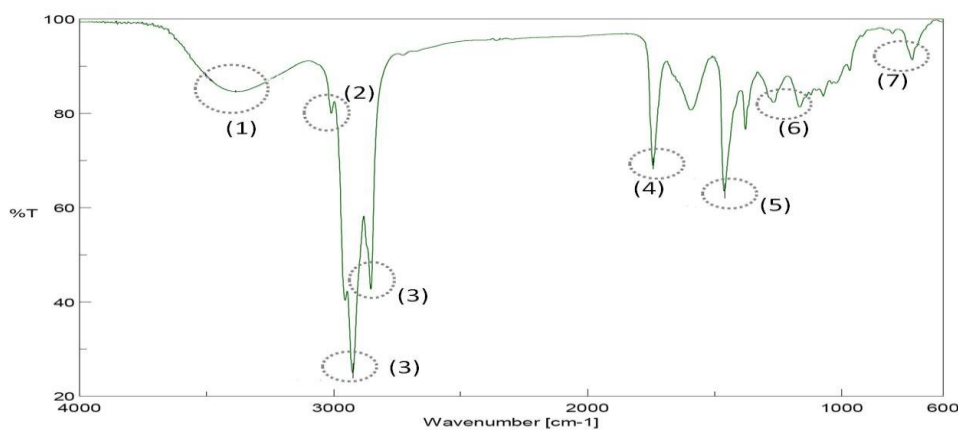


Figura 4- Espectros de IV da *Synechosystis sp2* e suas principais absorções (fração obtida a partir *n*-hexano via incubadora)

Conclusões

Os dados por CCD, observando-se os Rfs presentes nas cromatoplasas, mostraram que em todos os sistemas conseguiram extrair os mesmos constituintes majoritários (triglicerídeos, ácidos graxos e fosfolipídios), embora esta técnica não permita aferir em quais proporções estão presentes. Como esperado, através das análises por UV-Vis, observa-se que o extrato hexânico remove constituintes de menores comprimentos de onda, predominantemente triglicerídeos, quando

comparados com o perfil do óleo obtido pelo método Bligh & Dyer com sonicação (absorção mais intensa em 236-237 nm, características de compostos insaturados conjugados). Por FTIR visualiza-se a presença de triglicerídeos, corroborando o resultado de UV-Vis. Obteve-se, em todos os casos e nas condições empregadas, baixo teor lipídico mesmo quando empregado a sonicação. Esses resultados não são, contudo, conclusivos, considerando-se que o tempo de extração empregado foi muito reduzido. Trabalhos adicionais (em andamento) para avaliação da espécie, empregando-se ultrassom, irradiação por microondas, diferentes sistemas solventes e tempo de extração e análises por HPLC e CG possibilitará melhor avaliação da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CENPES/ PETROBRAS pela matéria-prima fornecida.

Referências Bibliográficas

ARIZONA STATE UNIVERSITY. Disponível em: <http://synechocystis.asu.edu/>. Acesso em 26 Abril de 2011.

BLIGH, E. G. And DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911- 917, 1959.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química. Nova*, v. 32, n. 4, p.849-854, 2009.

ICB.UFMG. Disponível em: http://www.icb.ufmg.br/~rmcp/energetica/MD3_A2B.htm. Acesso em 19 Maio de 2011.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. p.1-5, 2008.

MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

OGAWA, M.; MAIA, E. L.; FERNANDES, A. C.; NUNES, M. L.; OLIVEIRA, M. E. B.; FREITAS, S. T. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(2): 333-337, abr.-jun. 2007.

RENDA, S. Y. *Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico*. 2004, Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

REYNOL, F. Notícias BR do Brasil. *Ciência e Cultura*. V.60, n.2, p.1-5, 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Umidade em amostras p. 987. In: Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8a ed. São Paulo: Cengage Learning, 2009.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, M.E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. *Biodiesel*, 2006. Disponível em: <www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/MicroalgaComo.pdf - > Acesso em: 17 jul. 2008.

TOLENTINO, M. C. *Avaliação da qualidade de óleos vegetais sob estresse fotooxidativo e termoxidativo por espectroscopia de UV e RMN de ¹H*. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.