

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



TÍTULO DO TRABALHO:

AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO ÓLEO/BIODIESEL DA MICROALGA *chlamydomonas*

AUTORES:

CAMILA C. DE ALMEIDA, ALINE F. DA FONSECA, DAYANNE C. DE MOURA, LUANNA C. M. PAIVA, MARTA COSTA, CARLOS R. O. 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.

AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO ÓLEO/BIODIESEL DA MICROALGA *chlamydomonas*

Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms that convert sunlight, water and carbon dioxide into biomass. Because they are high in fat may be one of the largest reserves of biofuels in the future. This paper describes the results of the evaluation of *chlamydomonas* a potential source for biofuels. In this contest we analyzed the process of oil extraction in two different systems (Incubator and Ultrasound) and different solvents (hexane and FOLCH). The data showed a higher extraction yield of microalgae in the Folch method, though the samples did not show a clear manner which proves the presence of pigments due to the polarity of the solvents used. Was also analyzed to determine the Iodine performed by FTIR which showed the amount of iodine is calculated that the oils are extracted between classes of vegetable oils and unsaturated oils, which shows, depending on their income and their advantages in comparison other available raw materials, potentially useful for biodiesel production.

Keywords: microalgae, *chlamydomonas*, extraction of oil, infrared, iodine.

1. Introdução

Microalgas são microrganismos fotossintéticos e unicelulares que vivem em ambientes aquáticos (água doce ou salgada) e podem ser cultivadas em tanques ou fotobiorreatores cuja água, após recuperação da biomassa, pode ser reaproveitada (processo semi-contínuo). Têm ciclo de vida mais curto e podem, dependendo da região e espécie, reproduzir o ano inteiro (CHISTI, 2007). São compostas por proteína, carboidrato e lipídeo, cujo teor varia de 5 a 75% em massa seca e seus triglicerídeos apresentam composição em ácidos graxos (14 a 22 átomos de carbono) semelhante a dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Recentemente, diferentes estudos mostram diversas vantagens do uso de microalgas para produção de biodiesel em comparação com outras matérias-primas disponíveis (RODOLFI *et al.*, 2009). Dentre esses se destaca a produção de biomassa combinada com a fixação de dióxido de carbono, o que contribui para o aumento da produtividade da biomassa e redução do CO₂ na atmosfera. O ciclo de vida curto, desses microrganismos, revela seu potencial, como fonte de óleo, em quantidade suficiente para substituir o diesel fóssil.

O presente estudo descreve os resultados preliminares sobre o teor lipídico e a análise qualitativa e quantitativa da *chlamydomonas* (gênero de algas verdes unicelulares do filo chlorophyta), cultivada em regime de fotoperíodo. A avaliação qualitativa do óleo foi realizada através das análises por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região UV-Vis (200-780 nm), IV médio (4000 – 400 cm⁻¹) e índice de iodo dos extratos hexânico e Folch (CHCl₃/MeOH, 3:1) por IV.

2. Metodologia

2.1 Extração do Óleo

Para avaliação do teor lipídico, dois diferentes solventes [n-hexano e FOLCH (clorofórmio/metanol, 3:1), método clássico e referenciado na literatura para extração de lipídeos totais (FOLCH *et al.*, 1957)] foram empregados. Em cada caso, a biomassa (200 mg) previamente seca foi triturada, com o auxílio de almofariz e pistilo, e extraída com 50 mL de cada solvente (ambos de

grau PA e sem purificação) empregando-se ultrassom à temperatura ambiente e incubadora na temperatura de 60 °C.

2.1.1 Sistema Ultrassom

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, a mistura (biomassa + solvente) foi sonicada em banho ultrassônico (frequência 40 kHz, temporizador digital 0-30 min., potência ultra-sônica 120 Watts, modelo USC 1600, da UNIQUE) por 8 horas, com ciclos de 30 minutos e intervalos de 10 minutos em repouso. Depois de completado o tempo de extração, as amostras foram filtradas com auxílio de uma bomba de vácuo e, em seguida, o solvente foi removido em rotaevaporador (aproximadamente a 60°C). Os extratos oleosos foram secados em sulfato de sódio anidro para remoção da umidade residual. Em seguida, pesou-se a massa do extrato para posterior cálculo do rendimento.

2.1.2 Sistema Shake/Incubadora

Em um erlenmeyer de 125 mL, a mistura (biomassa + solvente) foi agitada em uma Incubadora (modelo Q816M21, da QUIMIS) com rotação de 300 rpm à temperatura de 60 °C, por 8 h. Ao final da extração, foi realizado o mesmo processo de filtração e evaporação descrito no sistema ultrassom.

2.2. Avaliação dos constituintes presentes no óleo

2.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada consiste em uma técnica de separação de misturas e identificação dos seus componentes utilizando duas fases: uma estacionária (sílica gel) e uma móvel, em que neste trabalho utilizou-se a mistura de solventes hexano/acetato de etila na proporção 9:1.

Para essa análise foram aplicadas alíquotas do extrato obtido, com auxílio de capilar de vidro sobre cromatoplas de vidro, usando como adsorvente sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV₂₅₄ e eluídos com o solvente descrito acima. Após eluição, os spots foram revelados com vapores de Iodo sublimado e os R_fs medidos com o intuito de qualificar os constituintes.

2.2.2 Análise de Ultravioleta (UV-Vis)

Os espectros de UV-Vis analisados na faixa espectral de 200 a 800 nm (com intervalos de 1 nm e medidas de absorbância de 0-10A, com intervalos de 0,1A) foram obtidos em um espectrofotômetro (Evolution 60, da Thermo Scientific) com cubeta de quartzo e caminho óptico de 10 mm. Para a análise, aproximadamente 0,05 mL de óleo foram solubilizados em 3 mL do solvente usado na extração, este foi utilizado também como branco na aquisição do espectro. Em seguida, foi plotado o gráfico de comprimento de onda (λ em nm) em função da Absorbância (Abs em Å).

2.2.3 Análises de Infravermelho e Determinação do Índice de Iodo (FTIR)

Para aquisição dos espectros de infravermelho (na região de 4000 – 400 cm⁻¹), foi usado espectrofotômetro FTIR 4200, JASCO, com resolução espectral 0,5 cm⁻¹, razão S/N 30 000:1. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, com 16 acumulações, por deposição de um filme fino do óleo, solubilizado em diclorometano, em janelas de KBr. A espectroscopia de infravermelho permite a identificação da presença de triglicerídeos, principais constituintes do óleo, além de subsidiar a avaliação do Índice de Iodo. Experimentalmente, o grau de insaturação de triglicerídeos é expresso pelo seu índice de iodo através do infravermelho, que é definido como o número de gramas de iodo absorvido por cem gramas de gordura (GOOCH, 2001).

3. Resultados e Discussão

3.1 Rendimentos das Extrações

Os rendimentos em porcentagem das quatro amostras de óleo obtidas nas extrações supracitadas foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento\%} = [(M_{st} \times 100)/M_o] \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: M_{st} representa a massa inicial (g) das sementes trituradas e M_o a massa (g) do óleo obtido.

Tabela 1. Rendimento (%) de lipídeos totais e aspecto visual do óleo.

Tipo Solvente	Rendimento %	Sistema de extração	Aspecto visual
Hexano	16,28	Ultrassom	Límpida
Hexano	17,05	Incubadora	Límpida
Folch	23,63	Ultrassom	Escura
Folch	20,84	Incubadora	Escura

O maior rendimento do óleo no sistema FOLCH deve-se ao fato da maior polaridade dos solventes utilizados, o que sugere que houve uma maior extração dos lipídios polares, além de ácidos graxos livres e outros componentes. (FOLCH et al., 1957).

3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os resultados da cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel como fase móvel (hexano/acetato de etila, 9:1) sugere após revelação com Iodo sublimado, a separação de uma mistura de componentes com taxas de retenção (R_f) diferentes em cada sistema.

Tabela 2. Análise CCD dos constituintes do óleo extraído com o solvente FOLCH.

RF (Padrão)	SUBSTÂNCIA	INCUBADORA	ULTRASSOM
0,54 (III)	Ésteres de ácidos graxos	0,74	0,74
0,42 (II)	Triglicerídeos	0,51	0,51
0,0 (I)	Fosfolipídios	0,07	0,07

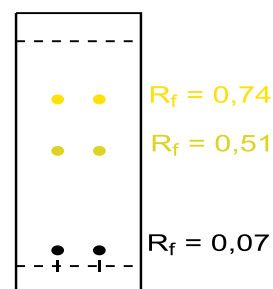
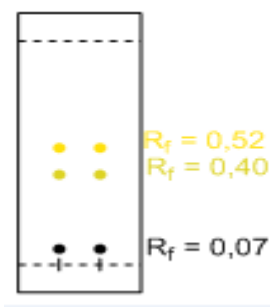


Tabela 3. Análise CCD dos constituintes do óleo extraído com o solvente hexano.

RF (Padrão)	SUBSTÂNCIA	INCUBADORA	ULTRASSOM
0,54 (III)	Triglicerídeos	0,52	0,52
0,42 (II)	Ácidos graxos	0,39	0,39
0,0 (I)	Fosfolipídios	0,07	0,07



3.3 Análise por espectro de Ultravioleta (UV-vis)

As análises de UV-Vis foram realizadas com as amostras extraídas do sistema hexano-incubadora e sistema FOLCH-incubadora.

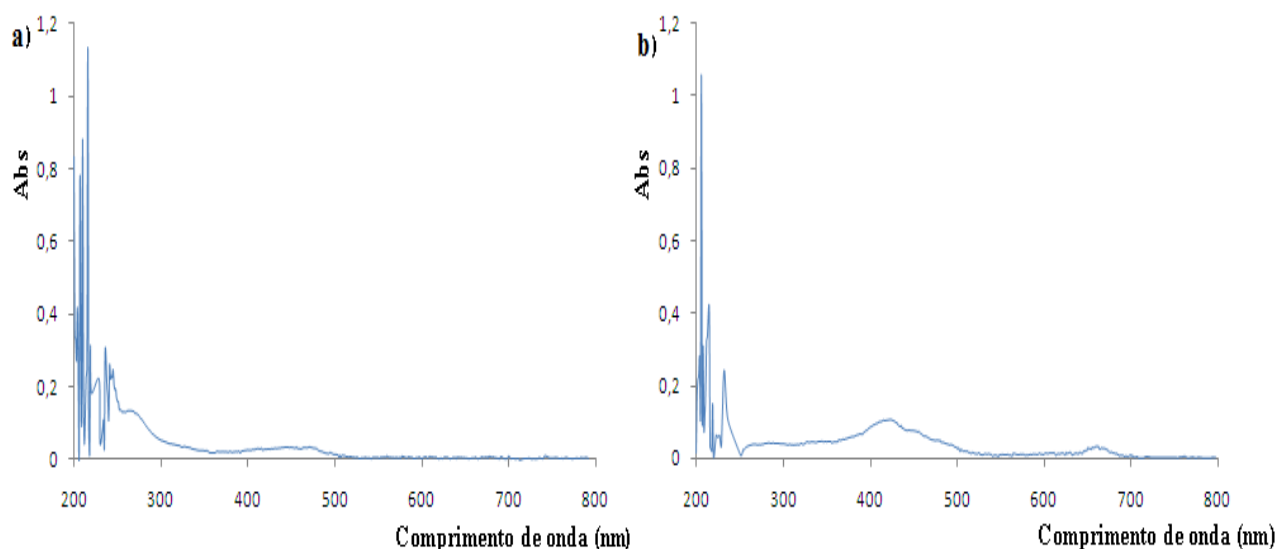


Figura 1. Espectros de UV-vis do óleo extraído do solvente hexano (a) e solvente FOLCH (b).

Em ambos os espectros (a) e (b), as absorções entre 230 e 270 nm demonstram o comportamento dos óleos e a presença de sistemas dienos e trienos conjugados, respectivamente (MORETTO & FETT, 1998). Para pigmentos, os espectros de absorção são obtidos na faixa de comprimento de onda de 350 a 550 nm (OGAWA et al., 2007). O espectro (b) reporta uma maior presença de pigmentos, o que é de se esperar devido à maior polaridade do solvente extrator.

As absorções observadas em destaque na região de pigmentos em (a) foram os comprimentos de 450 nm, sugerindo a presença do pigmento β - caroteno, e 470 de α -caroteno, ambos característicos de algas. Em (b) O comprimento em destaque de 435 nm sugere a presença Clorofila -b, e 660 nm pigmento característico de clorofila-a (ICB. UFMG, 2011).

3.4 Análise de Infravermelho e Índice de Iodo (FTIR)

Os espectros de absorvância na região do IV médio (Figuras 2 e 3) mostram um perfil típico de óleos vegetais nos quais predominam a presença de triglicerídeos. Observam-se absorções em 3010 cm^{-1} que corresponde à deformação axial da ligação H-C=C insaturado, da olefina, e um conjunto de picos, na região de 2850 a 2960 cm^{-1} , das deformações axiais, simétrica e assimétrica, dos grupos CH_3 , CH_2 e CH no carbono saturado. A região de absorção dos ésteres é verificada pelo estiramento da ligação dupla C=O, característica desses compostos que aparece em aproximadamente 1745 cm^{-1} . Essa absorção confirma a presença de triglicerídeos nas frações do óleo obtidas pelas extrações.

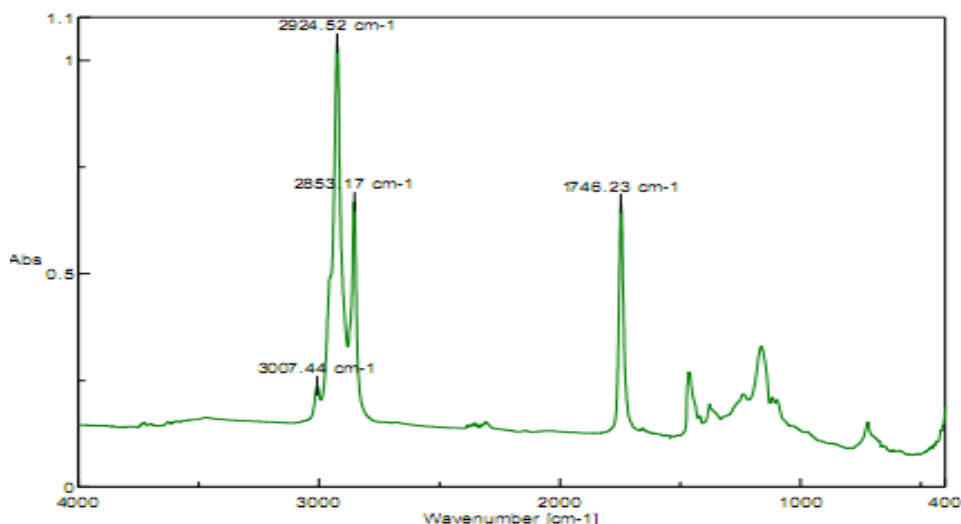


Figura 2. Espectro de IV da fração obtida na extração hexano e ultrassom.

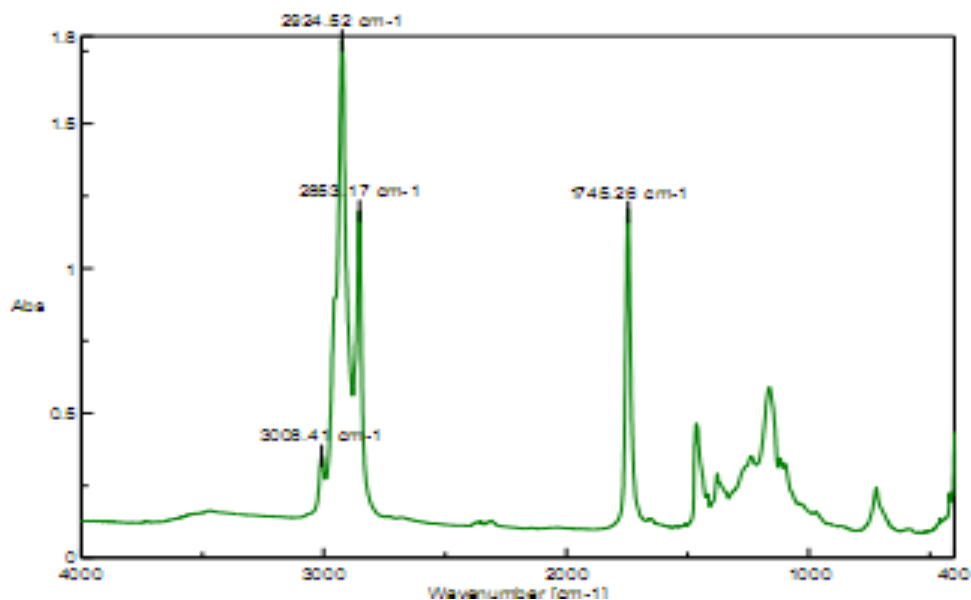


Figura 3. Espectro de IV da fração obtida na extração hexano e incubadora.

Para determinação do índice de iodo, por FTIR, adotou-se o procedimento descrito na literatura por GOOCH, 2001. Nesse caso, uma curva de calibração foi construída, empregando-se os valores de iodo de óleos vegetais, de forma a validar a Equação 2. Embora não tenha sido possível construir uma curva empregando-se o óleo da *chlamydomonas*, devido à quantidade insuficiente, os resultados (ainda não publicados) de cromatografia

gasosa (CG/MS) revelam que esse tem composição média [Palmitato 21.7%, Estearato 3.67%, Oleato 44.4%, Linoleato 16.1%. Linolenato 6,5%], semelhante aos de origem vegetal. Dessa forma, a Equação 2 pode ser empregada para o cálculo aproximado do índice de iodo que será, posteriormente, determinado experimentalmente.

$$IV = 740 (A_{olefinas} / A_{alcanos}) - 2$$

Eq. 2

R: 0,91

Na Eq. 2, o fator $A_{olefina}$ corresponde do estiramento C=C-H, da olefina, entre 3000 – 3050 cm^{-1} , e A_{alcano} é a absorbância C-H, do alcano, entre (2900- 2075 cm^{-1}).

Como esperado para qualquer método espectrofotométrico, a presença de interferentes insolúveis, como observado para o extrato obtido com a mistura $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, pode comprometer o resultado porque estes alteram a leitura da absorbância medida. Portanto, a Tabela 4 lista os resultados obtidos a partir do extrato hexânico.

Tabela 4. Absorções no espectro de FTIR e valores de índice de Iodo

Sistema Extração	$A_{olefina}$	A_{alcano}	Índice de Iodo
Incubadora	0,236896 cm^{-1}	1,03943 cm^{-1}	166,65
Ultrassom	0,35218 cm^{-1}	1,7862 cm^{-1}	143,90

De acordo com a literatura, os valores de índice de iodo para óleos vegetais variam de 80 a 150 e, para os insaturados, de 160 a 195 (GOOCH et al; 2001). Baseando-se na Equação 2 e nos valores das absorbâncias medidos nos espectros de FTIR, obteve-se, 166,65 e 143,90 respectivamente para os extratos hexânico empregando-se incubadora e ultrassom. Esses dados são consistentes com os resultados visualizados no espectro UV-Vis (Figura 4a), onde se pode observar uma série absorbâncias após 210 nm, característica de sistema conjugados, que não estão necessariamente associadas a cadeias de ácidos graxos. O índice de iodo de 143,90, dentro da faixa esperada para um óleo com aproximadamente 66% de ácidos graxos insaturados.

4. Conclusões

A avaliação de diferentes métodos de extração de lipídeos realizados com a espécie *chlamydomonas* mostra que os rendimentos mais satisfatórios foram com o método FOLCH. Entretanto, o uso de solventes polares provoca turvação do óleo uma vez que compostos mais polares, além de triglicerídeos e ácidos graxos livres, também são removidos. A análise por CCD revela que o óleo tem perfil graxo semelhante, independente da metodologia empregada, não sendo possível detectar diferença significativa entre eles. O aspecto límpido, assim como as análises por UV-Vis e FTIR, comprova que o óleo extraído com hexano é composto predominantemente por triglicerídeos (presença pouco significativa de H-O no espectro de IV) e o índice de iodo, calculado através das leituras de absorbância no FTIR, indicam que sua constituição é majoritariamente ácidos graxos insaturados.

Agradecimentos

Ao CNPq e CAPES pelo fomento e ao CENPES/ PETROBRAS pela matéria prima cedida.

Referências Bibliográficas

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

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

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G.H. A. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*. v. 226, p. 497-509, 1957.

GOOCH, E. E. Determination of the Iodine Value of Selected Oils: An Experiment Combining FTIR Spectroscopy with Iodometric Titrations. *Chem. Educator*. v. 6,p. 7.9, 2001.

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.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 102, p. 100-112, 2009.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.v. 101, p.87-96, 2006.