

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



TÍTULO DO TRABALHO:

Estudo do Óleo da microalga *Diploneis sp.* visando a produção de biodiesel

AUTORES:

Dayanne Chianca de Moura, Aline Felipe da Fonseca, Camila Carvalho de Almeida, Luanna Carla Matias Paiva, Marta Costa, Carlos Roberto de Oliveira 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 do Óleo da Microalga *Diploneis sp.* visando a produção de Biodiesel

Abstract

The term algae covers many different groups of living organisms. Are mostly found in the marine environment, freshwater and soil. The Microalgae grow ten times faster than the vegetables commonly used for biodiesel production, and some species have large amounts of oil. In this context, we developed the work here described, with the study of the energy potential of marine microalgae *Diploneis sp.*, diatoms, grown on Brazilian soil in the state of Rio Grande do North and rarely described in the literature. In this study describes the process oil extraction and ultrasound through incubation with different solvents and evaluating the average content in percentage. Consideration was also the constitution oil by TLC, UV-vis, IR and HPLC.

1 Introdução

O termo microalgas abrange diferentes grupos de organismos vivos encontrados em água doce, salina e no solo. São constituídos por ácidos nucleicos, proteínas, carotenóides e lipídeos (GRAHAM *et al.*, 2000) e crescem dezenas de vezes mais rapidamente que os vegetais (CHISTI, 2007). Em períodos de estresse ambiental e em condições de crescimento com deficiência de nutrientes, acumulam óleo cuja composição e índices de ácidos graxos variam de acordo com as condições de cultura (GRAHAM *et al.*, 2000). Seu teor lipídico que, em algumas espécies, é bastante elevada, tem sido bastante estudado por vários grupos de pesquisas devido a sua potencial aplicação na produção de biodiesel. Sua obtenção em larga escala apresenta, entretanto, uma série de problemas tecnológicos relacionados aos parâmetros de qualidade do óleo que pode conter, por exemplo, alto teor de ácidos graxos livres, o que impede seu uso direto em processos alcalinos tradicionais de obtenção de biodiesel (SUAREZ *et al.*, 2009).

Em função das características citadas, reporta-se que as microalgas constituem o único tipo de biomassa capaz de fornecer óleo, para produção de biodiesel, em quantidade suficiente que possa substituir total ou parcialmente os combustíveis fósseis (CHISTI, 2007).

O cultivo de microalgas no Nordeste do Brasil apresenta vantagens adicionais que justificam intensivas pesquisas na área, tais como, alta luminosidade e temperatura elevada que, como consequência, deve resultar em uma rápida reprodução e alto teor lipídico (LOURENÇO, 2006). Adicionalmente, o semi-árido, região de pouca chuva e pouco fértil para crescimento de outras oleaginosas pode, em princípio, ser explorado para essa finalidade. Nesse contexto, o presente trabalho investiga o perfil graxo e teor lipídico da diatomácea *Diploneis sp.*, pouco descrita na literatura, e cultivada no estado do Rio Grande do Norte.

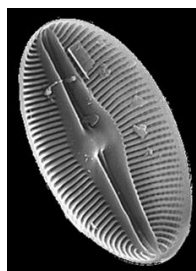


Figura 1. Imagem microscópica da *Diploneis sp.*

Nesse estudo descreve-se os resultados preliminares da avaliação qualitativa e quantitativa do teor de óleo com a diatomácea *Diploneis sp.* através da extração exaustiva do óleo via incubadora e por ultrassom com diferentes solventes e a avaliação do conteúdo médio. Analisou-se também a constituição do óleo por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Espectroscopia na Região do Ultravioleta Visível (UV-vis), Espectroscopia na Região do Infravermelho médio (IV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) visando identificar seu perfil lipídico.

2 Metodologia

A espécie da microalga marinha *Diploneis sp.* foi cultivada em laboratório. Seu cultivo se realizou em escala de laboratório sob iluminação artificial, fotoperíodo 12h claro e 12h escuro, o qual será posteriormente ampliado para tanques no estado do Rio Grande do Norte – Brasil.

2.1 Extração por solvente

Visando a comparação do teor lipídico empregou-se dois sistemas solventes, n-hexano e isopropanol/clorofórmio 1:1. Em ambos os casos, foram triturados 200mg de biomassa seca, com almofariz e pistilo, e posteriormente foi extraída com 50mL de solvente grau PA, empregando-se agitação orbital a temperatura de 60 °C e ultrassom.

2.1.1 Via Incubadora

Em um erlenmeyer de 125 mL, agitou-se a mistura (biomassa+solvente), a temperatura de 60 °C durante 8 horas ininterruptas, empregando-se uma incubadora/shake, modelo Q816M21, da QUIMIS). Ao final da extração, o extrato foi secado em sulfato de sódio anidro, para remoção da umidade residual, posteriormente filtrado com o auxílio de uma bomba de vácuo e transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL, previamente pesado. Este foi levado ao rotaevaporador (~60 °C), até completa evaporação do solvente, o que resultou no óleo usado para o cálculo do rendimento.

2.1.2 Via Ultrassom

Um balão de fundo redondo de 50 mL contendo a mistura (biomassa+solvente) foi levado para o banho ultrassônico (frequência 40 kHz, temporizador digital 0-30 minutos, potência ultra-sônica 120 Watts, modelo USC 1600, da UNIQUE) por 8 horas, com ciclos de 30 minutos e intervalos de 10 minutos. O mesmo processo de filtração descrito acima foi realizado ao término da extração.

2.2 Avaliação da fração lipídica

Após as extrações os cálculos de rendimento lipídico foram realizados tendo como referência a biomassa em peso seco inicial (m_o), e a fração lipídica final (m_f), conforme a Equação 1:

$$R = \frac{m_f}{m_o} * 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise por Cromatografia em Camada delgada (CCD), foram aplicados *spots* dos óleos com o auxílio de capilar de vidro sobre cromatoplasas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV₂₅₄ adsorvida em alumínio. Após eluição com a fase móvel hexano/acetato de etila (9:1), os *spots* foram revelados com vapores de Iodo sublimado.

2.2.2 Ultravioleta (UV-visível)

A análise de UV-vis foi realizada em um espectrofotômetro da Thermo Scientific Evolution 60, 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 800 nm, com intervalos de 1 nm e medidas de absorbância de 0-10A, com intervalos de 0,1A. Em seguida, os valores foram plotados com o auxílio do software VisionNite, acoplado ao equipamento, em um gráfico λ (nm) x Absorbância.

2.2.3 Infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do Infravermelho foram adquiridos por um espectrofotômetro FTIR 4200 da Jasco, com resolução espectral $0,5\text{cm}^{-1}$, razão S/N 30 000:1, na região de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$. As análises realizadas a temperatura ambiente, com 32 acumulações, por deposição de um filme de óleo solubilizado em diclorometano, em janelas de KBr. Os valores foram plotados em um gráfico de número de onda (cm^{-1}) x porcentagem de Transmitância (%T).

2.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A separação por CLAE foi efetuada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Jasco, série 2880, com sistema de bombeamento binário modelo PU-2080 *Plus*, gradiente em alta pressão, injetor manual e multicanal UV- 2077 *Plus*, detector UV-visível LC-Net II/ADC, cujo software acoplado é o EZChrom Elite. Para preparação da amostra, adicionou-se 0,02 g do óleo a 1,5 mL de Hexano; após filtração, alíquotas foram injetadas em uma coluna Hypersil GOLD (tamanho da partícula $5\mu\text{m}$, dim (mm) $150\times 4,6$) da Thermo Scientific.

A programação empregada consistiu em uma varredura de 5 minutos, com intervalos de 0,05 minutos, na fase móvel metanol:acetonitrila, iniciando em 80:20% e modificado a partir de 2 minutos até o final da corrida, com diminuição de polaridade em intervalos de 2% e fluxo de 0,8 mL até atingir a proporção de 56:44% (MeOH:ACN). Foram realizadas leituras nos comprimentos de onda de 200, 215 e 230 nm.

3 Resultados e Discussão

O desempenho comparado dos solventes extratores para remoção da fração lipídica contida na microalga marinha *Diploneis sp.*, por incubadora e banho ultrassônico, revelou rendimentos relativamente baixos nas condições empregadas e pouca diferença nas porcentagens com os solventes de baixa e média polaridade, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Aspectos gerais dos lipídeos obtidos.

Aspectos Gerais	<i>Diploneis sp.</i>		Sistema de extração
	(A)	(B)	
Rendimento (%)	2,88	2,41	Ultrassom
	6,76	8,04	Incubadora
Particularidade	Límpido	Límpido	Ultrassom/Incubadora

De modo geral, as paredes celulares rígidas de sílica nessa espécie de microalga apresentam diversidade de formas intrincadas e ornamentadas (ROUND & CRAWFORD, 1990) o que vem a dificultar a extração dos lipídeos presentes (dificuldade de rompimento da carapaça de sílica) justificando assim o baixo rendimento em óleo obtido no presente estudo. Para análise do perfil

lipídico empregou-se o óleo obtido com o sistema de extração que apresentou maior rendimento, a incubadora.

3.1 Análise da CCD

A Figura 3 mostra os principais constituintes do óleo por cromatografia em camada delgada e a Tabela 2 reporta aos valores de Rfs padrões, bem como os calculados na análise.

De forma geral, verifica-se através da análise por CCD, a presença de lipídios neutros - triglicerídeos e ácidos graxos, bem como o aparecimento de fosfolipídios (Figura 3 e Tabela 2) em todos os extratos. O fosfolipídio, por ser um lipídio polar, não sofre influência da fase móvel utilizada (hexano/acetato de etila - 9:1) ficando retido na origem.

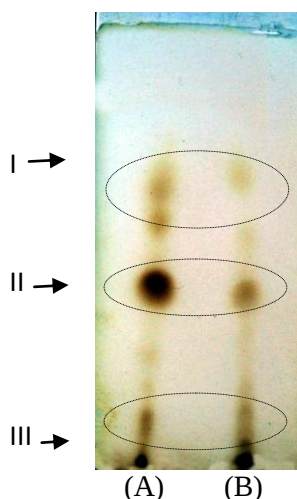


Figura 3. Plaquinha de CCD.

Tabela 2- Componentes das frações.

Compostos	Padrões (Rfs)*	<i>Diploneis sp.</i>	
		(A)	(B)
Triglicerídeos (III)	0,54	0,55	0,55
Ácidos Graxos (II)	0,42	0,46	0,48
Fosfolipídios (I)	0,0	0,0	0,0

*Padrões de lipídeos. ⁶

3.2 Análise do Ultravioleta na Região do Visível

A análise espectrofotométrica na região do UV-Vis fornece informações sobre o 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). Os espectros de UV-Vis (Figura 4) mostraram que o comportamento dos óleos extraídos pelo sistema solvente hexano e isopropanol/clorofórmio são semelhantes, pois suas regiões de absorções apareceram bem próximas.

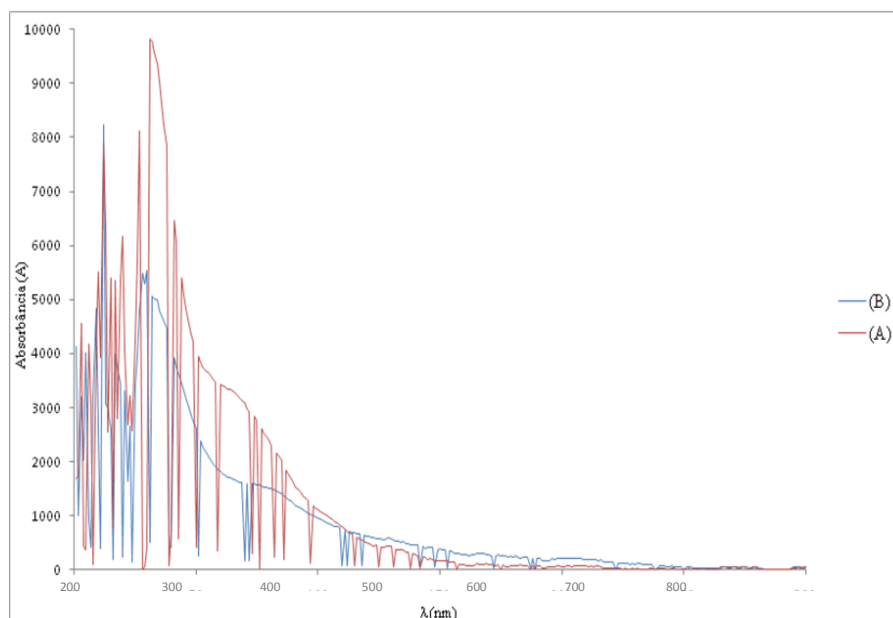


Figura 4. Espectro do Ultravioleta da *Diploneis sp.*

Os dados da análise de ultravioleta revelam absorções com comprimentos de onda baixos, o que sugere que o óleo, extraído da microalga *Diploneis sp.*, possui poucas insaturações, visto que não apresenta absorções significativas em comprimentos de onda maiores que 240 nm. As absorções em 212 e 213 nm sugerem a presença de triglicerídios, e absorções em 236 e 237 nm reportam a ácidos graxos com insaturações conjugadas. Esses dados revelam também a ausência de pigmentos e impurezas, já que esses compostos absorvem em valores de λ mais elevados.

3.3 Análise na Região do Infravermelho

A figura 5 reporta os espectros da região do infravermelho dos óleos extraídos pelos solventes A e B.

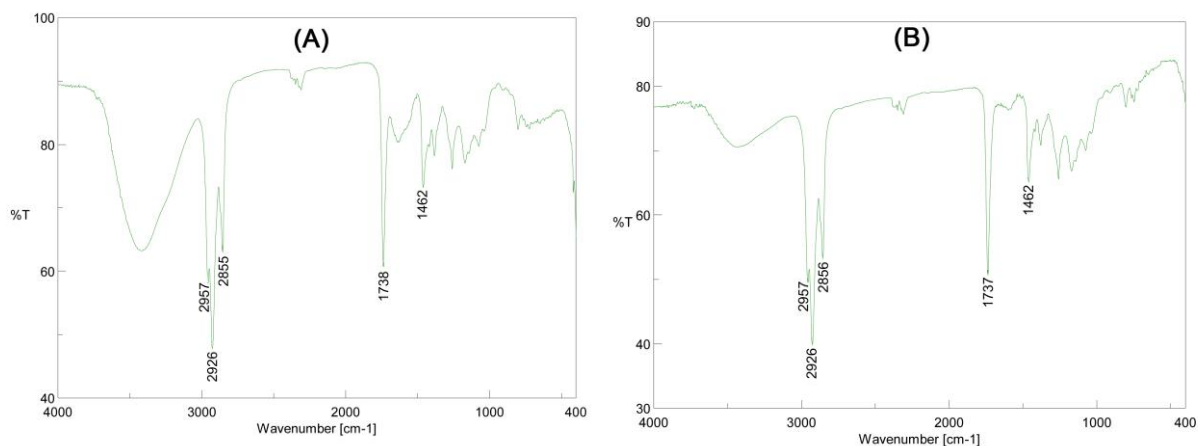


Figura 5. Espectros de Infravermelho da *Diploneis sp.*

A literatura reporta que a região entre 2960 a 2850 cm^{-1} indica a presença da deformação axial de C-H de alcanos, o que é observado em ambos os espectros. Esse fragmento é confirmado na região de 1470 a 1430 cm^{-1} pela deformação angular dos mesmos, que também pode ser identificado nas absorções acima. A presença de triglicerídios é confirmada pelo pico característico de ésteres no infravermelho, próximo em 1740 cm^{-1} que aparece devido ao estiramento da carbonila. Isso pode ser confirmado por absorções existentes entre 1242 e 1173 cm^{-1} , referentes à deformação angular do fragmento C-C(=O)-O e C-O. Ambas as extrações apresentaram-se de maneira semelhante, nessa

região do Infravermelho. Entretanto no solvente (A) se observa uma banda acima de 3000 cm^{-1} mais intensa que no solvente (B), o que refere-se a presença de umidade no óleo extraído que pode ter absorvida do meio após a extração dos mesmos, porém não exclui a possibilidade de remoção de compostos hidroxilados.

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A literatura descreve que nas análises de biodiesel o melhor comprimento de onda para detecção dos ésteres é 220 nm (HOLCAPEK *et al.*, 1999), quando estes são derivados de ácidos graxos. Portanto, a leitura em valores de comprimento de onda (λ) próximos a 220 nm pode ser útil para detectar a separação desse grupo.

A varredura realizada de 200 a 600 nm revelou, como esperado, que a análise cromatográfica do óleo *Diploneis sp.* apresenta melhor separação dos componentes e maiores resoluções de picos no comprimento de onda de 215 nm. Isso sugere um óleo de pureza elevada, visto que não foram detectados pigmentos e classes lipídicas diferentes dos triacilglicerídeos que são os compostos de interesse para a produção do biodiesel.

A Figura 6 mostra o cromatograma obtido na análise de CLAE para o óleo extraído com hexano (A). Neste foram identificados sete compostos, onde dois se apresentaram como majoritários (quarto e sétimo pico da esquerda para direita), porém atribuições a estes picos só serão realizadas posteriormente com análises comparativas com padrões de triglicerídeos que serão injetados nas mesmas condições da análise aqui descrita.

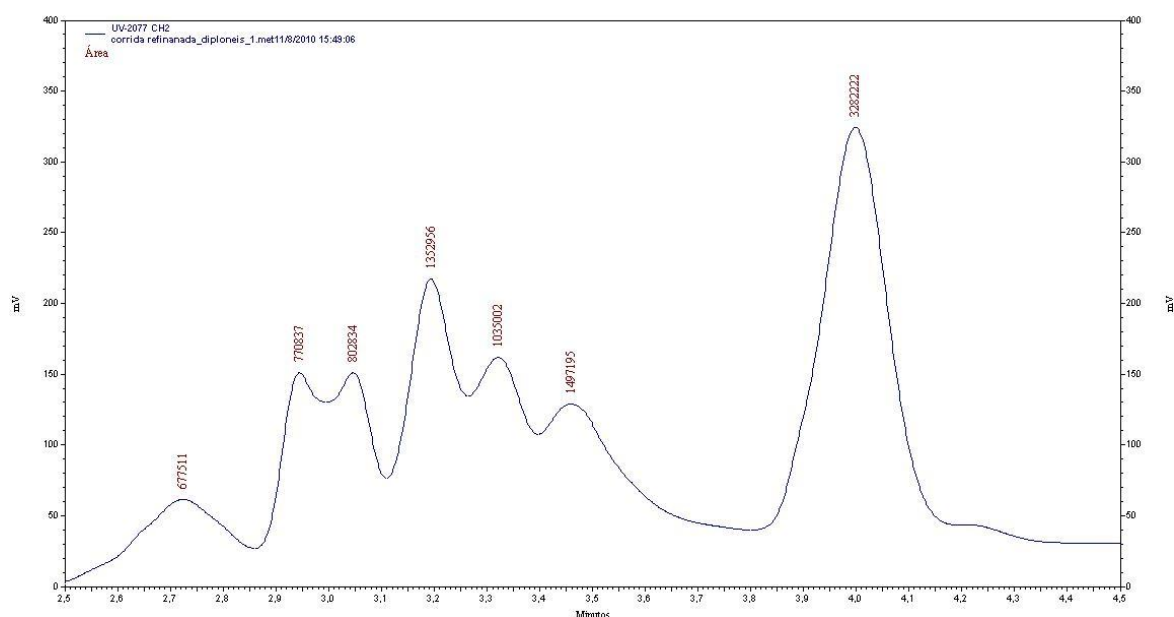


Figura 6. Espectro de CLAE do óleo da microalga *Diploneis sp.* extraído com hexano.

4 Conclusões

Os resultados mostram baixo rendimento em óleo mesmo quando empregados solventes de diferentes polaridades e técnicas que potencializam o rompimento da parede celular (ultrassom). As análises de cromatografia em camada delgada, ultravioleta nas regiões (UV-Vis) e infravermelho (IV) mostram que o óleo é constituído, essencialmente, por triglicerídeos, límpido, e isento de contaminantes. Portanto, de alto valor agregado, mesmo

considerando que seu teor seja baixo na espécie. Quando analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, confirmou-se a presença de poucos constituintes no óleo, sendo todos identificados em comprimentos de onda baixos, o que lhe atribui pureza e homogeneidade. Dois desses constituintes são majoritários, responsáveis pelas propriedades físico-químicas do biodiesel, serão posteriormente identificados, através de padrões por HPLC ou CG.

Agradecimentos

À CAPES, CNPQ e ANP pelo fomento. À EMPARN pela biomassa concedida.

Referências

- (1) 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, 4, 849-854, 2009.
- (2) CHISTI, Y., **Biodiesel from Microalgae**. *Biotechnology Advances*, 3, 25, 294-306, 2007.
- (3) GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W., **Algae**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.
- (4) HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKES, B., **Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods**, *Journal of Chromatography A*, 858, 13-31, 1999.
- (5) LORENÇO, S. O., **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa Editora, 2006.
- (6) ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G., **The Diatoms: biology & morphology of the genera**. British Library: Cambridge, 1990.
- (7) SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P. E.; ALVES, M. B., *Química Nova*, 32, 768, 2009.