



ESTUDO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA REAÇÃO DE TRANSTERIFICAÇÃO *IN SITU* DA *DESMODESMUS* SP.

V. de F. VIEIRA¹, L. F. RIOS PINTO^{1,*}, G.F. FERREIRA¹ e L.V. FREGOLENTE¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

*E-mail para contato: luisa.rpinto@yahoo.com

RESUMO – Nos últimos anos, o cultivo de microalgas para produção de óleo tem sido extensivamente estudado. A capacidade de algumas espécies em acumular lipídeos com perfis de ácidos graxos de cadeias contendo de 16 a 18 carbonos as torna potencial matéria prima para a produção de biodiesel. Entretanto, a etapa de extração de lipídeos para produção convencional de óleo de microalgas envolve elevados investimentos e custo de operação. Isto porque há necessidade de rompimento celular, uma vez que as microalgas têm uma parede celular rígida, impedindo o acesso dos solventes aos lipídios acumulados dentro das células. Desta forma, a transesterificação *in situ* apresenta-se como alternativa interessante, utilizando o álcool tanto como reagente quanto solvente, eliminando a etapa de extração. Neste trabalho, foi proposto o estudo da reação de transesterificação *in situ* da biomassa da cepa *Desmodesmus* sp. para a produção de biodiesel. Foram avaliados os efeitos das variáveis temperatura, tempo de reação, volume de álcool e porcentagem de catalisador sobre o rendimento de ésteres metílicos de ácidos graxos. Os resultados mostraram que o parâmetro temperatura de reação é o mais significativo na obtenção de ésteres.

1. INTRODUÇÃO

A redução de emissões de poluentes atmosféricos tem ocupado uma posição de destaque em conferências internacionais e políticas governamentais nas últimas décadas (Su et al., 2017), pois o efeito de acúmulo de gases de efeito estufa e outros poluentes na atmosfera não se limita apenas às mudanças climáticas e outros impactos ambientais, mas também desencadeia uma série de outros graves problemas de ordem econômica e social. Diante da relevância do tema, o desenvolvimento de novos combustíveis de fontes renováveis para substituição de combustíveis fósseis representa um item de alta prioridade na agenda de institutos de pesquisa, empresas de tecnologia e universidades do mundo inteiro.

Nesse contexto, as microalgas despontam como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel devido às suas características biológicas, como alta eficiência fotossintética, boa produtividade de biomassa e alto teor de óleo (Su et al., 2017). Além disso, apresentam vantagens econômicas, como possibilidade de cultivo em água salgada ou residual e potencial extração de produtos de alto valor agregado direcionados a outras indústrias, como a farmacêutica, a cosmética e a de alimentos (Oilgae, 2014).

1.1. Reação de transesterificação



A produção do biodiesel convencional é realizada por uma reação de transesterificação na qual um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) reage com os triacilgliceróis e ácidos graxos livres, convertendo-os em alquil ésteres de ácidos graxos.

Em geral, a reação de transesterificação é catalisada por ácidos (H_2SO_4 ou HCl), ou bases (KOH ou NaOH). Apesar de a catálise básica apresentar uma velocidade de reação maior que a catálise ácida, o uso de catalisador ácido muitas vezes é preferível porque ocorre uma reação paralela de saponificação entre álcalis e ácidos graxos livres, presentes em grandes quantidades na biomassa de microalgas, o que reduz o rendimento da transesterificação e emulsiona produto, dificultando sua separação (Fukuda et al., 2001).

1.2. Transesterificação *in situ*

A transesterificação *in situ*, ou direta, foi proposta por Harrington (1985) e consiste em utilizar o próprio álcool reagente como solvente, dispensando a extração prévia do óleo. Este método se apresenta como uma alternativa interessante para a produção de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que possibilita simplificar o processo, aumentar sua produtividade e eliminar uma das etapas de mais alto custo do processo, a extração de lipídios.

A temperatura, a porcentagem de catalisador, o tempo de reação e o volume de álcool que levam às condições ótimas de reação dependem fortemente da espécie de alga e do perfil de lipídios correspondente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. - Cepa de microalga

A cepa usada neste trabalho foi a *Desmodesmus* sp., a qual foi doada pelo Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA) do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil. Atualmente, é mantida no laboratório LOPCA/REF-BIORREF da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP e já existem vários estudos que mostram que essa é uma cepa promissora para a produção de biodiesel (Rios et al., 2015). O cultivo foi realizado exclusivamente para a obtenção da biomassa e não foram estudados parâmetros de crescimento. Este cultivo foi realizado em um banco de luzes, agitados por meio de agitação magnética e iluminados 24h por dia. A recuperação da biomassa do meio de cultivo foi realizada por meio de centrifugação (marca Eppendorf, modelo 5810R).

2.2. - Planejamento Experimental

Com o objetivo de determinar as melhores condições para otimização do rendimento de ésteres na reação de transesterificação *in situ*, foi realizado um planejamento fatorial fracionário (2^{k-1}) com duplicata no ponto central (nível 0) para a estimativa dos contrastes relacionados aos efeitos principais das variáveis independentes. Segundo a literatura, sabe-se que as variáveis independentes de grande importância para o processo são: tipo de álcool



(etanol, metanol), quantidade de catalisador, razão molar óleo:álcool, temperatura e tempo da reação. Com base nesta informação, as variáveis escolhidas para este estudo foram: porcentagem de catalisador, volume de álcool, temperatura e tempo de reação. Na Tabela 1, apresentam-se as faixas das variáveis estudadas.

Tabela 1 – Planejamento experimental em dois níveis.

Variável	-1	0	+1
Catalisador (%)	20	50	80
Temperatura (°C)	70	105	140
Volume de álcool (mL)	3	5	7
Tempo (h)	0,5	3,75	7

2.3. –Reação de Transesterificação *in situ*

Em tubos de ensaio de vidro de 50 mL com tampas rosqueáveis, para cada ponto estudado, foram adicionados cerca de 500 mg de biomassa. Logo após, adicionou-se 1 mL do solvente (clorofórmio), seguidos do álcool (metanol) e catalisador (ácido sulfúrico) nas quantidades estabelecidas no planejamento experimental. Também foi adicionado um agitador magnético para obter uma mistura homogênea de todos os reagentes durante a reação e, em seguida, colocaram-se os tubos em banho termostático de glicerina, considerando-se a temperatura e o tempo correspondente a cada experimento.

Após os tempos pré-determinados de reação, removeu-se o tubo do banho e o resfriou rapidamente, via banho de gelo, com o objetivo de parar a reação. Depois do resfriamento, realizou-se uma filtração a vácuo com passagem de água (50~60 °C) e hexano para retirar a biomassa. Repetiu-se a passagem de água e hexano algumas vezes para garantir somente a permanência da biomassa no filtro. A seguir, a fase líquida seguiu um processo de separação de fases em funil de separação, retirando-se a fase mais leve (ésteres) para um tubo previamente pesado. Finalmente, o solvente (hexano) foi, então, evaporado em estufa a 40 °C e os produtos (ésteres e biomassa) produzidos foram analisados gravimetricamente, até peso constante. Com os produtos pesados, considerou-se o rendimento a partir da massa da amostra e quantidade de lipídeos da microalga, $11,65 \pm 1,89$ %, previamente determinada pelo método Bligh & Dyer (1959).

2.4. - Análises Cromatográficas

O perfil de ácidos graxos dos produtos obtidos da reação de transesterificação *in situ* foi determinado via cromatografia gasosa. Primeiramente, os produtos obtidos foram divididos em 2 tubos (vial 1,5 mL e tubo 50 mL), com a finalidade de realizar a análise do produto bruto e do produto após uma reação de esterificação, respectivamente. Com cerca de 10 mg das amostras em vials, adicionou-se 200 µL de uma solução de heptadecanoato (C17) em metanol $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizada como padrão interno, para quantificação, completou-se o

volume com éter de petróleo e armazenou-se as amostras em freezer (-18°C) até o momento da análise.

Ao restante dos produtos (tubos 50 ml), adicionou-se 1 mL da solução padrão e realizou-se uma esterificação baseada na metodologia de Hartman and Lago (1973) para preparação de amostra.

Finalmente, conforme mencionado anteriormente, a composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, sendo aqui utilizado detector de ionização de chama (GC / FID 7890A Agilent) com coluna capilar Agilent (50% cianopropila e 50% de metilpolisiloxano) e Hidrogênio (H₂) como gás transportador. A quantificação de ácidos graxos foi baseada na metodologia descrita por Breuer et al. (2013) pela Equação 1.

A porcentagem de cada ácido graxo na amostra foi obtida pela fórmula:

$$C_{BD} = \frac{(A_t - A_{IS})}{A_{IS}} \times \frac{C_{IS} \times V_{IS}}{W} \quad (1)$$

Onde A_t é a área do pico do ácido graxo, A_{IS} é a área do padrão interno, C_{IS} é a concentração da solução do padrão interno (mg mL⁻¹), V_{IS} é o volume de padrão (mL) e W é a massa da amostra (mg).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são apresentados os pontos do planejamento e os respectivos resultados de rendimentos obtidos. Pela análise da Tabela, pode-se observar uma boa distribuição dos resultados e os valores do ponto central estão dentro dos limites de todos os experimentos.

Tabela 2 – Massas e Rendimentos

Ponto do experimento	Volume de álcool (mL)	Catalisador (uL)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rendimento (100*mg _{éster} /mg _{óleo})	Rendimento (100*mg _{éster} /g _{biomassa})
1	3	54	70	0,50	50,05	58,31
2	3	218	70	7,00	42,73	49,79
3	3	54	140	7,00	66,63	77,62
4	3	218	140	0,50	71,08	82,80
5	7	54	70	7,00	25,16	29,32
6	7	218	70	0,50	61,53	71,69
7	7	54	140	0,50	73,63	85,78
8	7	218	140	7,00	50,49	58,82
9	5	136	105	3,75	29,39	34,24
10	5	136	105	3,75	37,35	43,51



Dentre os rendimentos em ésteres etílicos alcançados na reação, o maior foi de 85,78 mg_{éster}/g_{biomassa} obtido nas condições de: 7 mL de metanol, 54 µL de catalisador (20%), 140 °C e 0,5 h de reação (Ponto 7).

A Tabela 3 mostra o perfil de ácidos graxos das amostras esterificadas para cada ponto do planejamento experimental. Os resultados apresentam as porcentagens de cada ácido em relação ao total de ácidos graxos identificados. As análises cromatográficas realizadas apresentam resultados dentro do esperado, uma vez que as microalgas do gênero *Desmodesmus* sp. possuem os ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) entre sua composição lipídica majoritária. Não se observou uma mudança significativa nas porcentagens dos ácidos graxos nos pontos do planejamento.

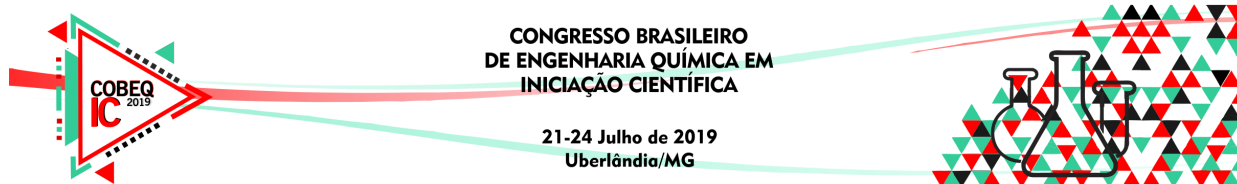
Foram identificados ésteres saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, com predomínio dos saturados, majoritariamente o C16:0. O grau de saturação afeta, principalmente, as propriedades de escoamento e estabilidade oxidativa do biocombustível. Pode-se observar pouca diferença entre os diferentes pontos do planejamento, quer dizer que o perfil de ácidos graxos não é significativamente afetado pelas condições da reação.

Tabela 3 – Porcentagem dos ácidos graxos identificados

Pontos do experimento										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C15:0	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:0	69,92	80,79	67,32	79,64	69,82	73,22	76,92	66,25	74,22	81,62
C16:1	2,72	-	3,91	-	3,08	2,97	2,28	3,76	2,86	-
C16:3	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:0	2,67	-	2,88	-	2,81	2,69	3,04	3,20	2,77	-
C18:1	16,81	19,21	20,85	16,43	18,17	16,95	13,54	20,87	16,54	18,38
C18:2	-	-	2,58	-	-	-	-	3,63	-	-
C20:0	0,88	-	-	-	1,36	-	-	-	-	-
C20:1	5,30	-	2,45	3,93	4,76	4,17	4,21	2,28	3,60	-

4. CONCLUSÕES

A reação de transesterificação *in situ* foi possível em todas as condições estudadas. Pode-se concluir então que o parâmetro temperatura de reação é o mais significativo na obtenção de ésteres. Uma vez que, os maiores rendimentos foram obtidos nas condições de 140 °C. O tempo da reação teve um efeito significativo negativo, pois o máximo rendimento foi encontrado no nível mínimo do tempo. O maior rendimento foi encontrado nas condições de maior temperatura, maior volume de álcool, menor volume de catalisador e menor tempo, obtendo um rendimento de 85,78 mg_{éster}/g_{biomassa}. Vale a pena ressaltar que com os dados dos rendimentos obtidos pode ser realizada a análise estatística, a qual será realizada em um trabalho futuro.



Na composição de ácidos graxos para os ésteres obtidos, em todas as condições estudadas, houve predominância de componentes saturados, sendo em média 76% dos ácidos identificados. Essa característica é inerente à espécie e gênero de microalga, pois é consequência direta da composição lipídica, e também é característica relevante que precisa ser considerada para a produção e viabilidade de biodiesel.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento da CNPq junto com o programa PIBIC/UNICAMP pelo suporte à pesquisa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Processos No 2014/10064-9 e 2015/20630-4.

6. REFERÊNCIAS

- AOCS Official Method Ce 2-66 Hartmann, L; Lago, LCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice. July 1973. Pág 475.
- 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, 1959.
- Braun, J. V.; Santos, V. O. B.; Fontoura, L. A. M.; Pereira, E.; Napp, A.; Seferin, M.; Lima, J.; Ligabue, R.; Vainstein, M. H. GC-FID METHODOLOGY VALIDATION FOR THE FATTY ESTERS CONTENT DETERMINATION IN BIODIESEL WITH HEXADECYL ACETATE AS THE INTERNAL STANDARD. Quim. Nova, Vol. 40, No. 9, 1111-1116, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170103>.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J. Biosci. Bioeng. 92, 405–416. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7)
- Harrington, Kevin J., D.-E., Catherine, 1985. Transesterification in situ of sunflower seed oil. Ind. Eng. Prod. Res. Dev. 24, 314–318. <https://doi.org/10.1021/i300018a027>
- Oilgae, 2014. Clixoo - Oilgae - Comprehensive Report on Attractive Algae Product Opportunities.
- Su, Y., Song, K., Zhang, P., Su, Y., Cheng, J., Chen, X., 2017. Progress of microalgae biofuel's commercialization. Renew. Sustain. Energy Rev. 74, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.078>