

# ANÁLISE DO BIODIESEL DE 3ª GERAÇÃO OBTIDO EM CULTIVOS HETEROTRÓFICOS DE *PHORMIDIUM AUTUMNALE*

R. R. DIAS<sup>1</sup>, S. F. SIQUEIRA<sup>1</sup>, É. C. FRANCISCO<sup>2</sup>, L. Q. ZEPKA<sup>1</sup> e E. JACOB-LOPES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Universidade de Passo Fundo, UPF, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Engenharia Ambiental, 99052-900, Passo Fundo, RS, Brasil  
E-mail para contato: jacoblopes@pq.cnpq.br

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi analisar qualitativamente o biodiesel de 3ª geração obtido em cultivos heterotróficos de *Phormidium autumnale* empregando como fonte de carbono orgânico a sacarose na concentração de 25,5 g/L. Os cultivos foram desenvolvidos em um biorreator de coluna de bolhas sob temperatura de 30°C e ausência de luminosidade. Foram determinados o perfil lipídico da biomassa e as propriedades de combustão do biodiesel produzido. A fração lipídica foi composta majoritariamente por ácidos graxos saturados e monoinsaturados, resultando em características de qualidade do biodiesel adequadas às normas nacionais (ANP255) e internacionais (ASTM6751 e EN14214).

## 1. INTRODUÇÃO

O biodiesel tem sido objeto de grande atenção nos últimos anos devido aos impactos ambientais e os altos preços do diesel oriundo de fontes fósseis. Além disso, é um combustível biodegradável, renovável e não-tóxico. O biodiesel pode ser produzido a partir de óleos vegetais ou de gordura animal. No entanto, outras fontes têm sido investigadas com o intuito de reduzir os custos de produção combinado a uma maior produtividade (Mata *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de tecnologias que permitam utilizar fontes renováveis de energia tem sido motivado pela grande demanda dos recursos energéticos pelos sistemas de produção, direcionando ao desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de fontes de energias alternativas e renováveis, como os biocombustíveis de 1ª a 4ª geração (Martín e Grossmann, 2012). Os biocombustíveis de 3ª geração são obtidos a partir do cultivo de microalgas, que possuem a capacidade de acumular lipídeos nas células, os quais, após extração, são transesterificados para a obtenção do biodiesel (Mata *et al.*, 2010).

As microalgas são microrganismos procariontes largamente distribuídos na natureza. São preferencialmente fotossintetizantes apesar de algumas linhagens, como *Phormidium autumnale* apresentarem a distinta capacidade de crescer sob condições heterotróficas na total ausência de luminosidade e presença de substratos orgânicos. Os cultivos heterotróficos superam algumas limitações dos sistemas fotossintéticos, como a dependência de luz, podendo viabilizar a produção de bioprodutos, além de ser uma alternativa com maior viabilidade econômica (Suali e Sarbathy, 2012).

Em contrapartida, a escolha da fonte de carbono orgânico pode ser um fator limitante para este tipo de cultivo, podendo afetar diretamente a qualidade da biomassa. Embora a glicose seja a fonte de carbono exógeno mais utilizada nos cultivos heterotróficos microalgais, outras fontes têm sido investigadas visando a otimização do sistema (Francisco *et al.*, 2013).

Em face disso, o objetivo do estudo foi avaliar o biodiesel de 3ª geração produzido a partir do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium autumnale*, utilizando sacarose como fonte de carbono orgânico, bem como caracterizar o biodiesel segundo parâmetros químicos e físicos de qualidade.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo e Meio de Cultura

A microalga utilizada foi a *Phormidium autumnale* isolada do Deserto Cuatro Cienegas no México (26°59'N 102°03W). Após purificação, as culturas estoque foram mantidas em tubos de ensaio com meio sintético BG11 (Rippka *et al.*, 1979) solidificado com ágar-ágar. As condições de manutenção usadas foram 30°C e intensidade luminosa constante de 1klux e aeração constante.

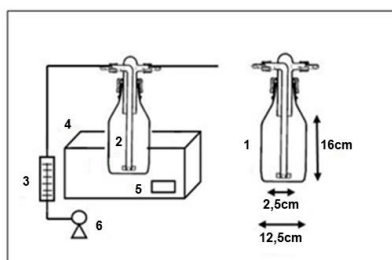
### 2.2. Meio de Cultura

Utilizou-se o meio sintético BG11 (Rippka *et al.*, 1979) para diluição e suplementação de nutrientes inorgânicos. A composição química do BG11 é:  $K_2HPO_4$  (0,03 g.L<sup>-1</sup>),  $MgSO_4$  (0,075 g.L<sup>-1</sup>),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,036 g.L<sup>-1</sup>), citrato de amônio e ferro (0,0006 g.L<sup>-1</sup>),  $Na_2EDTA$  (0,001 g.L<sup>-1</sup>),  $NaCl$  (0,00072 g.L<sup>-1</sup>),  $NaNO_3$  (0,015 g.L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (0,0006 g.L<sup>-1</sup>),  $Na_2CO_3$  (1,5 g.L<sup>-1</sup>), metais traços:  $[H_3BO_3]$  (0,0028 g.L<sup>-1</sup>),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0,0018 g.L<sup>-1</sup>),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,00022 g.L<sup>-1</sup>),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,00039 g.L<sup>-1</sup>),  $CoSO_4 \cdot 6H_2O$  (0,00004 g.L<sup>-1</sup>).

### 2.3. Biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator de coluna de bolhas, com volume total de trabalho de 2,0 L. As configurações operacionais estão representadas na Figura 1. Adicionalmente, a vazão de ar foi controlada por rotâmetros (precisão  $\pm 5\%$ ), a entrada de oxigênio e a saída dos gases foram filtradas através de unidades filtrantes Millex-FG®, em polipropileno com membrana fluoropore de 0,22  $\mu m$  de diâmetro e 50 mm de diâmetro total. As condições de cultivo foram pH 7,6, 100 mg/L do inóculo da microalga *Phormidium autumnale*, temperatura de 30°C, ausência de luminosidade, e aeração contínua de 1VVM (volume de ar por volume de efluente por minuto). O meio de cultura consistiu em meio sintético BG11 modificado e suplementado com sacarose para obter 25,5 g/L de concentração de carbono orgânico. A concentração de sacarose foi ajustada estequiometricamente.

Figura 1 - Configuração operacional do biorreator



1: Biorreator; 2: Difusor do ar comprimido; 3: Sistema para controle da vazão do ar comprimido; 4: Banho d'água; 5: Termostato digital; 6: compressor.

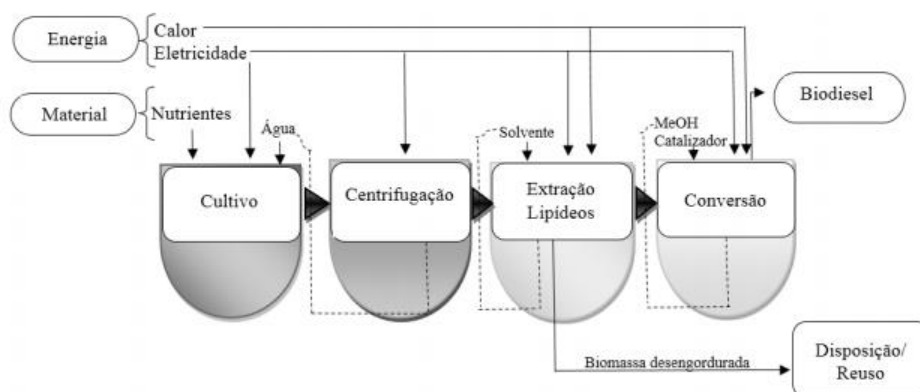
## 2.4. Amostragem e Métodos analíticos

As amostragens foram realizadas de forma asséptica a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo. A dinâmica do pH para os cultivos em biorreator, foi determinada por potenciômetro e a concentração celular através de gravimetria por meio da filtração de um volume conhecido em filtro 0,45 µm de diâmetro.

Extração e determinação quantitativa do lipídeo: Ao final do processo a biomassa foi separada do meio de cultivo por decantação, seguido de centrifugação. Em seguida, a pasta obtida foi seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 60°C. Para a extração de lipídeos totais da biomassa, foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959), levando-se em conta as proporções entre os solventes metanol e clorofórmio, e água destilada (2:1:0.8). Os lipídios da biomassa seca foram extraídos após secagem e trituração em almofariz. A quantidade de lipídeos foi determinada por gravimetria a partir do extrato total de clorofórmio, evaporando-se o solvente em atmosfera de nitrogênio e posteriormente seco em estufa e submetido a peso constante.

Análise biodiesel: A saponificação (metilação) foi realizada através de proporções entre metanol, ácido clorídrico e clorofórmio (10:1:1), seguida da esterificação do extrato lipídico, a partir da reação entre o hexano e o clorofórmio (4:1), através do método de Hartman e Lago (1976) modificado. A análise qualitativa e quantitativa do biodiesel foi realizada por cromatografia gasosa (CG) utilizando-se o cromatógrafo Varian 3400CX (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção a partir de um padrão (Supelco, Louis, MO, EUA) e quantificados por área de normalização. As propriedades de combustão do biodiesel foram determinadas de acordo com metodologia proposta por Talebi *et al.* (2014) que utilizou o software Biodiesel Analyzer (BiodieselAnalyzer© 1.1), onde avaliou-se o grau de insaturação, incluindo a quantidade saturada e insaturada dos ácidos graxos (DU); O índice de cetano (CN); as propriedades de fluxo a frio, incluindo o ponto de névoa (CP), ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP); a estabilidade de oxidação, incluindo a posição alílica (APE) e os equivalentes de posição bis-alílica (BAPE); o maior valor de aquecimento (HHV); µ: viscosidade; ρ: Densidade. A Figura 2 representa o processo de produção do biodiesel microalgal.

Figura 2 - Processo produção de biodiesel microalgal



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades do biodiesel como combustível são determinadas pelas características dos ácidos graxos que o compõem. Neste sentido, a Tabela 1 apresenta a composição dos ácidos graxos da biomassa microalgal. Observa-se a predominância de ácidos graxos saturados (45,20%), seguidos por ácidos graxos monoinsaturados (34,70%) e poli-insaturados (19,90%). Este perfil demonstra a potencialidade da aplicação deste tipo de biomassa como insumo para a produção de biodiesel, tendo em vista que óleos com composição predominantemente saturada e monoinsaturada são os mais adequados para a síntese de biodiesel (Knothe e Razon, 2017).

Tabela 1 - Perfil lipídico do cultivo.

Ácidos Graxos (%)	Óleo microalgal
SFA	45,20
MUFA	34,70
PUFA	19,90

SFA: somatório dos ácidos graxos saturados, MUFA: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: somatório dos ácidos graxos poli-insaturados.

Afim de avaliar o potencial de aplicação do biodiesel a partir da microalga *Phormidium autumnale*, foram determinadas as propriedades de combustão, tais como grau de instauração, índice de saponificação, índice de iodo, número cetano, o fator de cadeia longa saturada, ponto de entupimento de filtro a frio, ponto de névoa, posição alílica das duplas ligações, posição bis-alílica, estabilidade à oxidação, maior valor de aquecimento, densidade e viscosidade. Conforme mostrado na Tabela 2, o biodiesel de *Phormidium autumnale* apresentou grau de insaturação e índice de saponificação favorável, o que reflete em uma estabilidade oxidativa que atenda as normas nacionais e internacionais. De acordo com a norma ASTM 6751, EN 14214 e ANP 255, o aumento da concentração de insaturação e do índice de saponificação no biodiesel aumenta a estabilidade oxidativa do combustível. Em contrapartida para a soja o índice de saponificação não atende as normas de qualidade, assim ficando mais susceptível a auto oxidação.

Além da estabilidade oxidativa, o ponto de entupimento de filtro a frio observado para a microalga é de 7,09°C, o que em equilíbrio com o ponto de névoa revela a sua eficiência para a operação a baixas temperaturas. Embora o biodiesel de soja tenha um ponto de entupimento de filtro a frio de -2°C, essa cultura carece em estabilidade oxidativa (Bhatii *et al.*, 2008; Mathimani, *et al.*, 2016). Além disto, para o maior valor de aquecimento, o biodiesel de soja apresentou um valor inferior ao do biodiesel de microalgas. Segundo Makareviciene *et al.* (2015), um valor de aquecimento inferior pode influenciar o desempenho operacional do motor e aumentar o consumo de combustível dos motores.

Em geral, a alta viscosidade e densidade do biodiesel leva a uma fraca atomização, altos depósitos de carbono e falha na bomba de combustível. No presente estudo, a densidade e a viscosidade do biodiesel foi de 0,87 g/cm<sup>3</sup> e 4,68 mm<sup>2</sup>/s respectivamente, assim atendendo aos padrões de qualidade. Estes valores são consistentes com o biodiesel produzido por *Nannochloropsis* sp. que apresentaram uma densidade e viscosidade de 0,86 g/cm<sup>3</sup> e 5,76 mm<sup>2</sup>/s respectivamente (Chen *et al.*, 2012).

Por outro lado, foi possível encontrar um maior número de cetano no biodiesel de microalgas em relação ao da soja, isto ressalta o potencial do uso de microalgas como insumo

para a produção de biodiesel uma vez que, quanto maior o número de cetano (gorduras saturadas), menor atraso de ignição nos motores e menores emissões de NO<sub>x</sub> (Behçet, 2011). Além disto, os demais parâmetros estão todos em conformidade com os limites estabelecidos pelos padrões nacionais e internacionais (ANP 255, 2003, EN 14214, 2003, ASTM 6751, 2002).

Tabela 2 - Propriedades do biodiesel para o cultivo heterotrófico da *Phormidium autumnale* empregando sacarose como fonte de carbono.

Parâmetros	Cultivo (Microalga)	Leguminosa		Normas	
	Sacarose	Soja <sup>a</sup>	ASTM 6751	EN 14214	ANP 255
DU (%)	74,5	-	-	-	-
SV (%)	211,8	-	-	-	-
IV (%)	70,04	128,0	-	Máx 120	-
CN (%)	56,31	49,0	Min 47	Min 51	Min 45
LCSF	7,5	-	-	-	-
CFPP (°C)	7,09	-2	-	-	-
CP (%)	6,87	2	-	-	-
APE (%)	66,0	-	-	-	-
BAPE (%)	22,0	-	-	-	-
OS (h)	8,52	-	Min 3	Min 6	Min 6
HHV (%)	39,5	17,153	-	-	-
μ (mm <sup>2</sup> /s)	4,68	4,546	1,9 – 6,0	-	-
ρ (g/cm <sup>3</sup> )	0,87	0,887	-	-	Máx 0,9

DU: grau de instauração, SV: índice de saponificação, IV: índice de iodo, CN: número cetano, LCSF: fator de cadeia longa saturada, CFPP: ponto de entupimento de filtro a frio, CP: ponto de névoa, APE: posição alílica, BAPE: posição bis-alílica, OS: estabilidade à oxidação, HHV: maior valor de aquecimento, μ: viscosidade, ρ: densidade. <sup>a</sup>Knothe (2017).

## 4. CONCLUSÃO

O cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale* utilizando sacarose como fonte de carbono orgânico geraram uma biomassa adequada à manufatura do biodiesel. O perfil de ácidos graxos do óleo microalgal apresentado foram predominantemente saturados para o cultivo, resultando em um biodiesel com propriedades de combustão de acordo com as principais normas nacionais e internacionais.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO) 255. Provisional Brazilian Biodiesel Standard ANP. Brasil, 2003. Total de 21p.
- ASTM 6751. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100). Blend Stock for Distillate Fuels. United States of America, 2002. In: KNOTHE, G. et al. (Ed.). The biodiesel handbook. Champaign, Illinois: AOCS. 332p, 2005.
- BEHÇET, R. Performance and emission study of waste anchovy fish biodiesel in a diesel engine. *Fuel Processes Technology*, v. 92, pp. 1187-1194, 2011.
- BHATTI, H.; HANIF, M.; QASIM, M. Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*, v. 87, p. 2961-2966, 2008.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37, n.8, p.911-917, 1959.



- CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource Technology*, V. 111, p. 208-2014, 2012.
- FRANCISCO, E. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.95, p. 395-403, 2010.
- FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Quim. Nova.*, v.36, p. 437-448, 2013.
- GALADIMA, A.; MURAZA, O. Biodiesel production from algae by using heterogeneous catalysts: A critical review. *Energy*, v. 78, p. 72-83, 2014.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Practice*. 22, 475-476, 1976.
- KNOTHE, G.; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. *Prog. Progress in Energy and Combustion Science*. Combust. 58, 36-59, 2017.
- MARTÍN, M.; GROSSMANN, I. E. On the synthesis of sustainable biorefineries. *Industrial & Engineering Chemistry Research.*, v.52, p.3044-3064, 2012.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and their applications: a review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews.*, v.14, p.217-232, 2010.
- MATHIMANI, T.; BEENA NAIR, B.; KUMAR, R.R. Evaluation of microalga for biodiesel using lipid and fatty acid as a marker a central composite design approach. *Journal of the Energy Institute*, v. 89, p. 436-446, 2016.
- MAKAREVICIENÉ, S.; LEBEDEVAS, P.; RAPALIS, M.; GUMBYTE, V.; SKORUPSKAITE, J. Performance and emission characteristics of diesel fuel containing microalgae oil methyl esters. *Fuel*, v. 120, p. 233-239, 2014.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; e STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology.*, v.111, n.1, p.61, 1979.
- SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4316-4342, 2012.
- TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer<sup>®</sup>: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. *Biofuel Research Journal.*, v.2, p. 55-57, 2014.
- UNE-EN 14214. Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods. European Union. 15p, 2003. In: KNOTHE, G. et al. (Ed.). The biodiesel handbook. Champaign, Illinois: AOCS. 332p, 2005.