

# REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

## TRANSESTERIFICAÇÃO DIRETA DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* PRODUZIDA EM EFLUENTE DOMÉSTICO UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES E TEMPERATURAS<sup>1</sup>

ELIAS TREVISAN<sup>2</sup>, KEMELY BRUNA ZANDONADI FERRIANI BRANCO<sup>2</sup>, PEDRO  
AUGUSTO ARROYO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Publicado no 1º Trimestre de 2018;

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá- UEM, eliastrevisan@yahoo.com.br,  
kemelybruna@hotmail.com, arroyo@deq.uem.br.

### Resumo

Para a síntese de ésteres a partir de microalgas visando à produção de biocombustíveis, uma das possibilidades é a utilização da transesterificação direta, metodologia que possibilita reduzir o número de operações unitárias no processo. Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o rendimento em ésteres etílicos e a composição em ácidos graxos destes, obtidos na transesterificação direta da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio alternativo de efluente doméstico, utilizando os solventes hexano e clorofórmio, em quatro temperaturas distintas. A partir dos resultados obtidos, podem-se observar diferenças significativas quanto ao desempenho dos solventes hexano e clorofórmio, a partir de seu efeito como auxiliar na extração dos lipídeos da biomassa, durante a reação *in situ*. Dessa forma, o hexano apresentou um desempenho superior ao clorofórmio, sendo obtido um rendimento em ésteres etílicos de  $137,75 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , em um tempo de 150 minutos de reação, a  $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por outro lado o rendimento máximo em ésteres etílicos alcançado com o clorofórmio foi de  $75,40 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , a  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , com 60 minutos de reação, sendo este ainda inferior ao hexano nas mesmas

condições ( $91,25 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ). A composição em ácidos graxos para os ésteres etílicos obtidos, em todas as condições avaliadas, apresentou um predomínio de componentes insaturados, que tendem a permanecer acima de 70%, sendo que estas características podem levar a um ganho nas propriedades de ponto de entupimento do filtro a frio. Esses resultados indicam a potencialidade de utilização da transesterificação direta da biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* para a obtenção de ésteres etílicos, visando ao processo de produção de biocombustíveis.

**Palavras-chave:** Biomassa microalgal, ácidos graxos, reação *in situ*, ésteres etílicos, biocombustíveis.

## DIRECT TRANSESTERIFICATION OF *CHLORELLA VULGARIS* MICROALGAE PRODUCED IN DOMESTIC EFFLUENT USING DIFFERENT SOLVENTS AND TEMPERATURES

### Abstract

For a synthesis of esters from microalgae for the production of biofuels, one of the possibilities is a use of direct transesterification, a methodology that makes it possible to reduce the number of unitary units in the process. The objective of this study was to evaluate the yield of ethyl esters and the fatty acid composition obtained from the direct transesterification of *Chlorella vulgaris* microalgae grown in an alternative domestic effluent medium using hexane and chloroform solvents at four different temperatures. From the results obtained, it is possible to observe significant differences in the performance of the solvents hexane and chloroform, from its effect as an auxiliary in the extraction of the lipids of the biomass, during the reaction *in situ*. Thus, hexane performed better than chloroform, yielding an ethyl ester yield of  $137.75 \text{ mg}_{\text{ester}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1}$  in a reaction time of 150 minutes at  $90^\circ \text{C}$ . On the other hand, the maximum yield in esters ethyl acetate obtained with chloroform of  $75.40 \text{ mg}_{\text{ester}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1}$ , at  $75^\circ \text{C}$ , with 60 minutes of reaction, which is still lower than hexane in the meteorological conditions ( $91.25 \text{ mg}_{\text{ester}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1}$ ). The fatty acid composition for the ethyl esters obtained, under all evaluated conditions, presenting a predominance of unsaturated components, which tend to a space above 70%, offering these characteristics can lead to a gain in the properties of a filter clogging point cold. These results indicate the potential use of the direct transesterification of the microalgae

biomass *Chlorella vulgaris* for the production of ethyl ethers, aiming at the biofuel production process.

**Keywords:** Microalgal biomass, fatty acids, in situ reaction, ethyl esters, biofuels.

### Introdução

A utilização de energias renováveis tem se intensificado nas últimas décadas e, dentre estas, pode ser destacado o uso da biomassa como fonte de biocombustíveis, sendo os mais importantes o biodiesel e o etanol. Geralmente, a produção de biocombustíveis pode ser realizada a partir de óleos e gorduras vegetais ou animais ou, ainda, com a utilização de várias espécies de microrganismos (WAHLEN et al., 2011; CARVALHO Jr. et al., 2011). As principais plantas oleaginosas que têm sido utilizadas na produção de biocombustíveis são as que possuem usos na alimentação humana (matéria prima de primeira geração), tais como a soja, o milho, a canola e o girassol. Desse modo, tem se buscado alternativas para essas oleaginosas que não são utilizadas na alimentação humana e/ou animal, sendo consideradas matérias primas de segunda geração (McGINN et al., 2011), tais como óleos não comestíveis ou óleos e gorduras residuais (OGR). Ainda nesse contexto, mais recentemente, outras fontes de matérias primas, tais como as microalgas (matéria prima de terceira geração), vêm ganhando destaque em várias pesquisas ao redor do mundo, principalmente, devido à sua flexibilidade de uso, alta produtividade e à possibilidade de adaptação de cultivo em diferentes ambientes (WIDJAJA, CHIEN e JU, 2009).

Microalgas são microrganismos que possuem um rápido crescimento, possuem um grande número de espécies, podem ser cultivadas em áreas inadequadas para a agricultura e até mesmo utilizar águas residuárias para suprir a sua necessidade por nutrientes (MIAO e WU, 2006, McGINN et al., 2011, GAURAV et al., 2017), condições estas que podem ser muito vantajosas quando o objetivo é a produção de biocombustíveis. As microalgas em sua composição possuem basicamente proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos graxos, sendo que as concentrações se diferenciam de acordo com a sua espécie e as características ambientais que são cultivadas. As condições de crescimento são importantes na formação da composição dos lipídeos, que tipicamente é composta por glicerol, açúcares ou bases esterificáveis e ácidos graxos (MIAO e WU, 2006, BAUMGÄRTNER et al., 2013, ISLABÃO et al., 2016). Além

disso, os ácidos graxos podem ser saturados, monossaturados ou, ainda, poli-insaturados, sendo estas características influenciadas pela disponibilidade de carbono e nitrogênio no ambiente de crescimento das microalgas (SMEDES e ASKLAND, 1999, LEWIS et al., 2000, McGINN et al., 2011).

Para a produção do biodiesel tradicionalmente utilizam-se óleos que são convertidos por meio da reação de transesterificação, usando um álcool de cadeia curta, tais como metanol e etanol, responsáveis por fornecer os radicais metila e etila (VISENTAINER, 2012), respectivamente, e um catalisador básico ou ácido, sendo que à medida que a reação avança são gerados o glicerol e um conjunto de ésteres de ácidos graxos (EAG) como produtos (KNOTHE et al., 2006, WAHLEN et al., 2011).

Como alternativa ao processo clássico de produção de biodiesel, tem-se adotado o processo de transesterificação direta das microalgas usando soluções com álcool, catalisador e um solvente, juntamente com a biomassa. Desse modo, busca-se eliminar o processo de extração e purificação dos lipídeos da biomassa, sendo essas etapas encontradas nos processos convencionais de produção do biodiesel (WAHLEN et al., 2011; CARVALHO Jr. et al., 2011; BAUMGÄRTNER et al., 2013; TAVARES et al., 2017). Com base nessas características, a transesterificação direta da biomassa microalgal pode alcançar valores semelhantes para a recuperação de ácidos graxos aos que seriam obtidos por métodos que realizam a extração seguida de transesterificação. De fato, Lewis et al. (2000) obtiveram 51% de ésteres com a extração direta, via reação *in situ* da microalga, e 53% de ésteres com extração dos lipídeos seguida da reação de transesterificação. Os mesmos autores ainda destacam que a transesterificação direta foi mais eficiente na recuperação de ácidos graxos saturados e insaturados, indicando que este pode ser um caminho a ser seguido na recuperação de ácidos graxos da biomassa microalgal.

Baseado nesses aspectos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o rendimento em ésteres etílicos e a composição em ácidos graxos destes, obtidos na transesterificação direta da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio alternativo de efluente doméstico, utilizando os solventes hexano e clorofórmio, em quatro temperaturas distintas.

## Materiais e Métodos

### *Espécie utilizada e condições de cultivo*

A cepa de *Chlorella vulgaris* foi gentilmente cedida pela Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) - RJ. Os cultivos de reprodução e manutenção foram conduzidos no Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel (LCHBio), no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá. Para isso, foi utilizado meio de cultivo sintético DM (WATANABE, 1960), em ambiente com clima controlado a  $25 \pm 2$  °C, sendo mantido com fotoperíodo de 24 h e borbulhamento por injeção de  $1 \text{ L min}^{-1}$  de ar atmosférico, fornecido por um compressor da marca Schulz.

### *Cultivo da microalga em efluente doméstico*

O efluente utilizado no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* foi coletado do reator anaeróbio da estação de tratamento de esgoto ETE 2 – Sul, da empresa SANEPAR, que atende à região sul da cidade de Maringá – PR. O efluente coletado foi inicialmente filtrado, para a remoção de partículas com tamanho superior a  $7 \mu\text{m}$  e, em seguida, foi submetido ao tratamento de desinfecção por meio de luz ultravioleta, durante 30 minutos.

Para a produção da biomassa microalgal foram usados erlenmeyers com volume de 1 L, em que foram adicionados 500 mL de água desionizada com o inóculo e 500 mL de efluente filtrado e desinfetado. Durante os 16 dias que se seguiram foi mantido um ambiente com temperatura controlada em  $25 \pm 1$  °C e um fotoperíodo de 24 h fornecido por quatro lâmpadas fluorescente de 20 watts cada, totalizando 5.000 lux. O meio foi agitado com a injeção de ar comprimido fornecido por um compressor da marca Schulz, com uma vazão de  $1 \text{ L min}^{-1}$ .

Para a colheita da microalga *Chlorella vulgaris* foi realizada a floculação prévia da biomassa, com o floculante natural Tanfloc – SL, o qual é produzido pela empresa Tanac e foi gentilmente doado para o presente estudo. A operação de floculação foi seguida por decantação e filtração em tela de 20 mesh, para, então, obter-se a biomassa microalgal. Posteriormente, a secagem da biomassa microalgal foi realizada em estufa, na temperatura de 60 °C, por um período de 24 horas.

### *Reação de transesterificação direta da biomassa de microalga *Chlorella vulgaris**

A produção de ésteres alquílicos foi realizada segundo a metodologia proposta por Lewis et al. (2000) e adaptada por Baumgärtner et al. (2013). Trata-se de uma metodologia que utiliza a biomassa microalgal seca, sem necessidade de um processo para a extração do óleo. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A metodologia é descrita a seguir.

Em tubos de vidro de 10 mL com tampas rosqueáveis foram adicionados em torno de 20 mg de biomassa seca. Em seguida, realizou-se a adição de 3 mL de uma solução composta por álcool (etanol), catalisador (ácido clorídrico) e solvente (hexano ou clorofórmio), em uma razão 10:1:1 (v:v:v). Posteriormente, a solução formada foi agitada manualmente de maneira a realizar a suspensão da biomassa e, em seguida, colocada em banho termostatizado, a uma temperatura e tempo pré-determinados. Os tempos de reação estudados foram de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Estas condições foram testadas em temperaturas de 45, 60, 75 e 90 °C.

Após o tempo pré-determinado de reação, o tubo foi retirado do banho e resfriado rapidamente, por meio de banho de gelo. Após o resfriamento adicionou-se 1 mL de água desionizada para a parada da reação, sendo, em seguida, realizada a adição de 2 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio, na proporção de 4:1 (v:v), para promover a separação de fases. Após a formação das fases, a parte sobrenadante foi recolhida em um tubo, sendo este procedimento repetido por três vezes, visando, assim, à completa remoção dos ésteres etílicos produzidos.

O solvente foi, então, evaporado em estufa a 60 °C e os ésteres etílicos produzidos foram diluídos em uma solução de hexano e de éster metílico de ácido tricosanóico (C23:0), com uma concentração conhecida, sendo este utilizado como padrão interno (PI), conforme descrito a seguir, a partir da metodologia proposta por Visentainer e Franco (2006) e Visentainer (2012). A amostra foi armazenada em freezer a -8 °C, para posterior análise cromatográfica.

### *Análises cromatográficas*

A composição dos produtos obtidos da reação de transesterificação direta da microalga *Chlorella vulgaris*, foi realizada por meio da conversão dos lipídeos em componentes mais voláteis (ésteres metílicos), identificados por cromatografia em fase gasosa, utilizando um Cromatógrafo Varian, modelo CP – 3800, com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos BP – X70 – SGE de 30 m x 0,25

mm. Como gás de arraste utilizou-se o hélio, numa razão *Split* de 1:10. A programação de temperatura da coluna cromatográfica para a análise iniciou a 140 °C, com aquecimento até 250 °C, a uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura do detector foi de 220 °C e do injetor de 260 °C. Foi injetado 1 µL de amostra por meio de uma seringa cromatográfica para realizar a análise.

Ao final da análise, com a obtenção do cromatograma da amostra, foi realizada a identificação dos ésteres etílicos pela comparação dos tempos de retenção na coluna com aqueles obtidos para uma amostra padrão, na qual os respectivos ésteres metílicos estavam presentes (VISENTAINER e FRANCO, 2006). Assim, para se identificar os ésteres etílicos, foi utilizado um padrão FAME Mix (fatty acid methyl ester), da marca Sigma-Aldrich, que possui 37 diferentes ésteres, contemplando os ésteres de ácidos graxos presentes em óleos, após a derivatização, e, também, na amostra obtida a partir da reação *in situ* da microalga *Chlorella vulgaris*. Para confirmar a presença dos ésteres etílicos de ácidos graxos também foi realizada uma análise cromatográfica utilizando um padrão FAEE Mix (fatty acid ethyl ester), da marca Sigma-Aldrich, que possui nove diferentes ésteres, por meio da comparação dos tempos de retenção do padrão e da amostra.

Para quantificar os ésteres etílicos (EAG) utilizou-se a metodologia da padronização interna, descrita em Visentainer e Franco (2006). O éster metílico tricosanóico 99% (Sigma-Aldrich) foi adotado como Padrão Interno (PI), por ser este um componente não identificado em amostras de produtos da transesterificação direta da biomassa microalgal (VISENTAINER, 2012). Cabe ressaltar que, para o cálculo da massa de EAG presentes na amostra analisada, foram utilizados fatores de correção para os ésteres, em relação ao padrão interno (PI). Os fatores usados para a correção da resposta diferencial foi o fator de correção experimental (F<sub>CE</sub>), cujo valor é determinado experimentalmente e o fator de correção teórico (F<sub>CT</sub>), determinado teoricamente a partir do número de carbonos ativos (C\*), conforme descrito em (VISENTAINER e FRANCO, 2006; VISENTAINER, 2012). Além de determinar o fator de conversão de éster metílico/etílico para ácido graxo (F<sub>CEA</sub>) utilizando a relação entre a massa molar do éster etílico e a massa molar do ácido graxo, visando corrigir a resposta diferencial do detector entre um éster etílico e o seu ácido graxo (VISENTAINER, 2012).

A partir da determinação destes parâmetros foi calculado a massa do ácido graxo e do éster etílico. A determinação da massa do ácido graxo utilizou-se a relação:

$$M_x = \frac{A_x \cdot M_p \cdot F_{CT}}{A_p \cdot F_{CEA} \cdot M_a}$$

sendo que:

$M_x$  é a massa do ácido graxo x na amostra analisada de lipídeos totais ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $M_p$  é a massa do padrão interno (mg);  $M_a$  é a massa de lipídeos totais (g);  $A_x$  é a área no cromatograma relativa ao ácido graxo x na amostra analisada;  $A_p$  é a área no cromatograma relativa ao padrão interno na amostra analisada;

Nas reações *in situ*, o valor de  $M_a$  foi adotado o valor da massa de biomassa utilizada na reação. Obtendo-se, assim, a massa de éster produzido por grama de biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{éster}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ).

## Resultados e Discussão

### *Produção de ésteres etílicos*

Na figura 1 são apresentadas as curvas cinéticas da reação de transesterificação *in situ* da microalga *C. vulgaris*, em diferentes temperaturas, utilizando solventes diferentes. Verifica-se uma diferenciação evidente da influência do solvente e da temperatura no rendimento da produção de ésteres etílicos, a partir da biomassa seca de microalga. Destaca-se aqui que a quantidade  $\text{mg}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$  é denominada de rendimento em éster no presente trabalho.

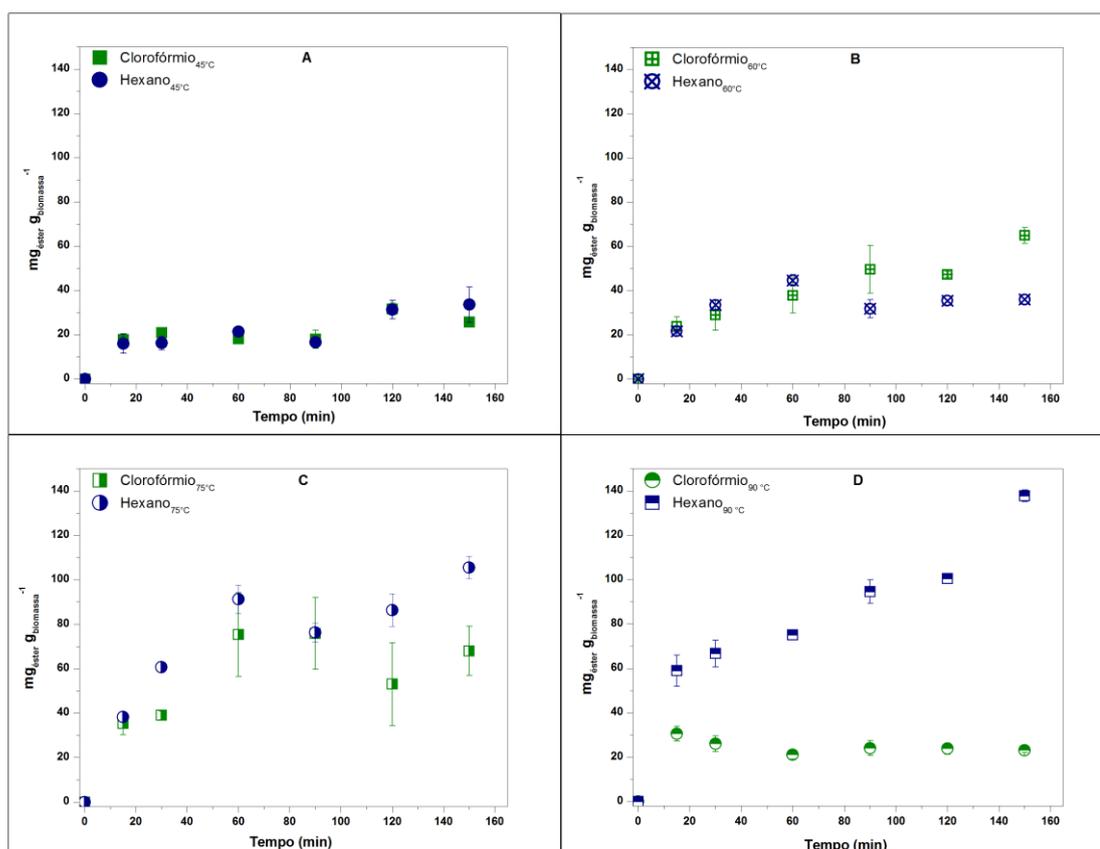


Figura 1 – Rendimento em ésteres etílicos obtidos por reação *in situ* da microalga *C. vulgaris* em função do tempo, para os solventes hexano e clorofórmio, em diferentes temperaturas.

Na Figura 1A são apresentados os rendimentos em ésteres etílicos obtidos a partir da reação *in situ* realizada na temperatura de 45 °C, utilizando clorofórmio e hexano como solventes. Estes resultados mostraram que os rendimentos em ésteres etílicos obtidos não possuem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para 150 minutos de reação. Além disso, os valores e a tendência do comportamento foram muito semelhantes para os dois solventes avaliados. Dentre os rendimentos em ésteres etílicos alcançados na reação, o maior foi de  $33,6 \pm 7,95 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , obtido com 150 minutos de reação. Estes valores demonstram que independente do solvente, os resultados tendem a ser inferiores do que as condições que se fizeram uso de temperaturas mais elevadas, indicando ser este um importante fator no processo de produção de ésteres que deve ser considerado.

Estes valores estão abaixo do obtido por Baumgärtner et al. (2013) que, utilizando a mesma metodologia com a microalga *Spirulina platensis*, obtiveram um rendimento em ésteres etílicos próximo de  $50 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , com 60 minutos de reação e clorofórmio como solvente. Já o uso do hexano como solvente resultou em um rendimento em ésteres etílicos

próximo a  $70 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , com 10 minutos, no entanto, a partir disto a reação apresentou uma tendência de redução do rendimento em ésteres etílicos. Por outro lado, no presente trabalho, os rendimentos em ésteres etílicos obtidos mantiveram-se estáveis em torno de  $20 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , por 90 minutos, e elevando-se para  $30 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , com 120 e 150 minutos de reação.

O aumento da temperatura durante a utilização dos diferentes solventes proporcionou uma elevação no rendimento de ésteres etílicos obtido nas reações de transesterificação *in situ*. Diante disso, a velocidade cinética das reações com temperatura de  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 1B) foram superiores às obtidas com  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esses resultados apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o clorofórmio e hexano, com um tempo de 150 minutos de reação, sendo o melhor resultado alcançado com o clorofórmio, que resultou em  $64,9 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ . Para o uso de hexano a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e 150 minutos de reação foram obtidos  $35,9 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , porém, o rendimento máximo em ésteres etílicos foi de  $44,7 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , obtido com 60 minutos de reação.

Os valores de rendimento em ésteres obtidos no presente trabalho, com ambos os solventes, também estão abaixo dos obtidos por Cavalcanti et al. (2014), que utilizando a microalga *C. vulgaris* alcançaram rendimentos de  $87,32$  e  $218,32 \text{ mg}_{\text{produto}} \text{ g}_{\text{biomassa liofilizada}}^{-1}$  para ésteres metílicos e etílicos, respectivamente. Esta diferença nos resultados pode estar associado a duas características distintas entre os cultivos, sendo que o presente trabalho utilizou efluente de reator anaeróbico sem complementação do  $\text{CO}_2$ , enquanto que Cavalcanti et al. (2014) fizeram a complementação com  $\text{CO}_2$  e mantiveram o cultivo por 139 dias. Entre as diferenças das duas condições de cultivo, a que se destaca é a agitação com ar enriquecido com  $\text{CO}_2$ , que como destacado por McGinn et al. (2011) influência de forma significativa a composição dos ácidos graxos e o teor de lipídeos presentes na microalga.

A realização da reação *in situ* a  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 1C) apresenta um aumento do rendimento em ésteres etílicos. Além disso, a partir de 60 minutos ocorre a estabilização da reação utilizando o clorofórmio, com um rendimento em ésteres etílicos de  $75,40 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ . Entretanto, o hexano proporciona uma tendência de aumento no rendimento em ésteres etílicos que se mantém até o final da reação (150 minutos), sendo obtido  $105,55 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ . O comportamento possui diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando é avaliado o resultado dos rendimentos em ésteres etílicos, demonstrando que o aumento da

temperatura contribui de maneira mais efetiva para o hexano do que para o clorofórmio. A ocorrência de maior rendimento nas reações com hexano do que com o clorofórmio também é identificado em experimento realizado por Baumgärtner et al. (2013). Os autores avaliaram a microalga *Spirulina platensis*, por meio da mesma metodologia, sendo que o maior rendimento em ésteres etílicos obtido foi com hexano, em 60 minutos de reação, alcançando aproximadamente  $50,0 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ . Cabe ressaltar que a diferença entre os rendimentos utilizando mesma metodologia estão relacionados com a espécie de microalga, no que concerne ao teor de lipídeos e características da estrutura da parede celular.

O maior rendimento em ésteres etílicos foi obtido com temperatura de  $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 1D), alcançando um valor médio de  $137,75 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , com um tempo de 150 minutos de reação. Esse rendimento foi obtido utilizando o hexano como solvente no meio reacional, enquanto que o uso do clorofórmio apresentou um rendimento médio de  $23,13 \text{ mg}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , com 150 minutos de reação. Essa diferença nos rendimentos entre as reações com hexano e clorofórmio pode ser associada à evaporação de cada solvente, apesar de as temperaturas serem próximas,  $68$  e  $61 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Deste modo, não pode ser desconsiderado a maior volatilização do clorofórmio a  $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , o que pode ter ocasionado um desequilíbrio no meio reacional ou até mesmo pequenos vazamentos. De fato, tendência semelhante foi obtida por Baumgärtner et al. (2013), a partir das reações *in situ* com a microalga *Spirulina platensis*, em que foram observados como melhor resultado a utilização de hexano, com um aumento progressivo no rendimento em ésteres etílicos, à medida que ocorria um aumento no tempo de reação.

#### *Composição em ácidos graxos*

A composição em ácidos graxos resultantes da reação *in situ* da microalga *C. vulgaris* é apresentada nas Figuras 2 e 3. Na Figura 2 são mostrados os resultados obtidos a partir da reação de transesterificação direta utilizando o hexano como solvente, para os ácidos graxos saturados, monossaturados e poliinsaturados ao longo de 150 minutos de reação, em quatro temperaturas distintas. Verifica-se uma tendência de diminuição na concentração de ácidos graxos saturados à medida em que aumenta o tempo e a temperatura da reação. Já para as temperaturas de  $45$ ,  $60$  e  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ocorre um aumento dos ácidos graxos mono e poliinsaturados.

Por outro lado, quando é utilizada a temperatura de 90 °C, os ácidos graxos monossaturados também possuem uma redução nos valores obtidos.

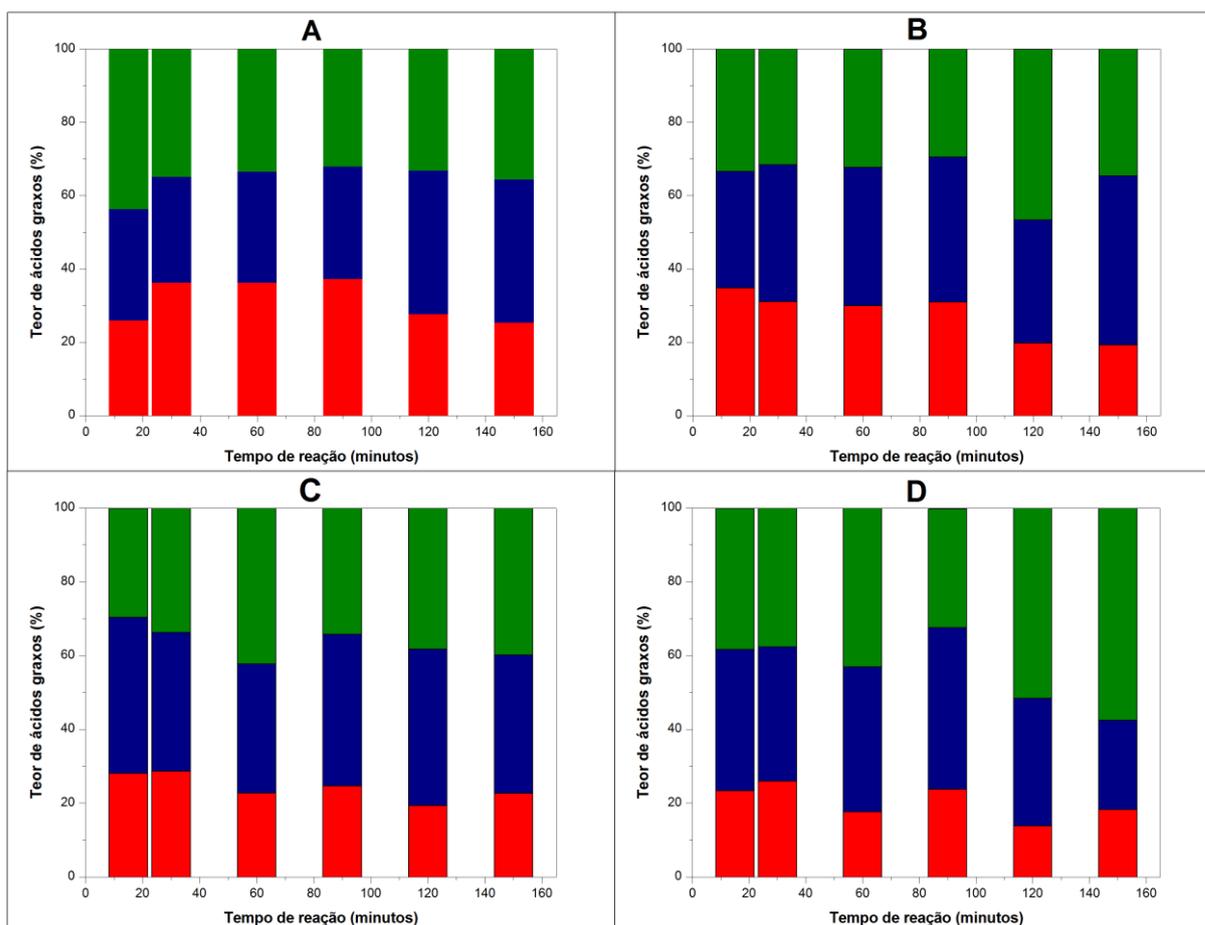


Figura 2 – Composição em ácidos graxos saturados (vermelho), monoinsaturados (azul) e poliinsaturados (verde) obtidos a partir da reação *in situ* utilizando hexano como solvente, nas temperaturas de 45 (A), 60 (B), 75 (C) e 90 (D) °C.

Assim, como já destacado na seção 3.1, à medida que se aumenta a temperatura das reações tem-se um acréscimo nos rendimentos em ésteres obtidos na reação, que pode estar relacionado a uma maior solubilidade e extração do ácidos graxos com o aumento da temperatura do meio reacional. Fato semelhante ocorre com os valores de ácidos graxos poli-insaturados, que são apresentados na Figura 2. Assim, à medida que se aumenta a temperatura das reações, provavelmente ocorre uma maior extração dos lipídeos, em que os processos de

oxidação das maiores cadeias não possuem efeitos significativos. Os maiores rendimentos em ésteres etílicos obtidos estão associados às maiores temperaturas devido ao fato de que o aumento da temperatura resulta em uma maior pressão de vapor dos solutos, juntamente com a diminuição da viscosidade e da densidade do solvente, o que facilita a ruptura da parede celular e extração dos lipídeos (TAVARES et al., 2017).

Na Figura 3 são apresentados os resultados obtidos a partir da utilização do clorofórmio como solvente na reação de transesterificação direta da microalga *C. vulgaris*. Os valores indicam que nessas reações os rendimentos em ésteres etílicos obtidos apresentaram uma tendência de redução dos valores dos ácidos graxos saturados com o aumento do tempo de reação e da temperatura, enquanto que os ácidos graxos poliinsaturados possuem tendência de manter-se estável, próxima a 30% dos ésteres obtidos. Porém, as concentrações dos monoinsaturados possuem uma tendência de aumento a medida que aumenta-se as temperaturas de trabalho.

Essa diferença entre hexano e clorofórmio, tanto no que diz respeito ao rendimento de éster por grama de biomassa, quanto na composição dos EAG, pode ser associado a características distintas dos solventes. Enquanto que o hexano age na extração dos hidrocarbonetos, triacilgliceróis e ácidos graxos, o clorofórmio além destes também atua sobre os carotenoides, clorofila, esteróis, ceras e aldeídos (VEIGA, 2010). Além disso, a polaridade conforme a classificação de Snyder (1974) do clorofórmio é de 4,4 enquanto que do hexano é 0,0, essa diferença também influencia na extração dos compostos de interesse já que ocorre uma maior presença de lipídeos polares, sendo que o hexano apresentara uma maior eficiência na disponibilização dos lipídeos para a reação.

Além dos fatos mencionados anteriormente, Oehrl et al. (2001) destacam que os ácidos graxos ligados a esteróis sofrem diferentes níveis de ataques oxidativos, sendo que os EAG poliinsaturados são os mais afetados quando utilizadas temperaturas elevadas, pois o ácido graxo será atacado antes do esterol. Enquanto que os saturados apresentam uma menor oxidação, sendo que os esteróis são atacados com maior facilidade resultando, assim, em uma maior degradação destes.

Entretanto, ao avaliarmos os resultados obtidos tem-se uma redução dos EAG saturados que é associado a dois fatos. O primeiro, segundo Smedes e Askland (1999) a exposição da biomassa a solventes não-polares tem como característica a ruptura celular antes

da extração dos lipídeos. Mas tal aspecto é caracterizado quando são misturados separadamente os reagentes, diferentemente, a metodologia aqui empregada faz uso de uma solução com o álcool, solvente e o catalisador já misturados. Essa alternativa faz com que o etanol tenha uma função de um bloqueador, protegendo a parede celular do ataque do clorofórmio reduzindo este efeito sobre a parede celular e conseqüentemente diminuindo o rendimento de ésteres e os ácidos graxos resultantes. Já o segundo fato, apontado por Lewis et al. (2000), ocorre uma redução dos ácidos graxos saturados em função do aumento do tempo de exposição a reação e também um aumento na recuperação de monossaturados com o aumento do tempo de reação. Logo, a recuperação dos monossaturados é mais difícil do que a dos saturados e poliinsaturados.

A distribuição dos ácidos graxos nos ésteres etílicos obtidos na reação *in situ* indica que, com o hexano como solvente, ocorre uma menor oxidação das cadeias de ácidos poliinsaturados, enquanto que estes, utilizando o clorofórmio como solvente, possuem uma redução nos valores, indicando a atuação destes mesmos processos oxidativos sob estes ácidos graxos. Essa tendência indica que pode ocorrer uma espécie de proteção aos ácidos graxos poliinsaturados por parte do hexano durante a reação e uma maior ruptura das paredes celulares e que interage de forma benéfica com o aumento do tempo, bem como da temperatura de reação.

Assim, há predominância para ambos os solventes de ácidos graxos insaturados nos ésteres etílicos obtidos nas reações *in situ* da *C. vulgaris*. Essa tendência está de acordo com os obtidos por Branco et al. (2014), que utilizaram a microalga *Scenedesmus accuminatus*, alcançando aproximadamente 70 % de ácidos graxos, com um predomínio dos monoinsaturados. Os autores ainda destacaram que este perfil promove ganhos nas propriedades de ponto de entupimento do filtro a frio, já que isso ocorre com biodiesel que possuem elevadas concentrações de saturados, pois estes tem seu ponto de fusão superior ao dos saturados.

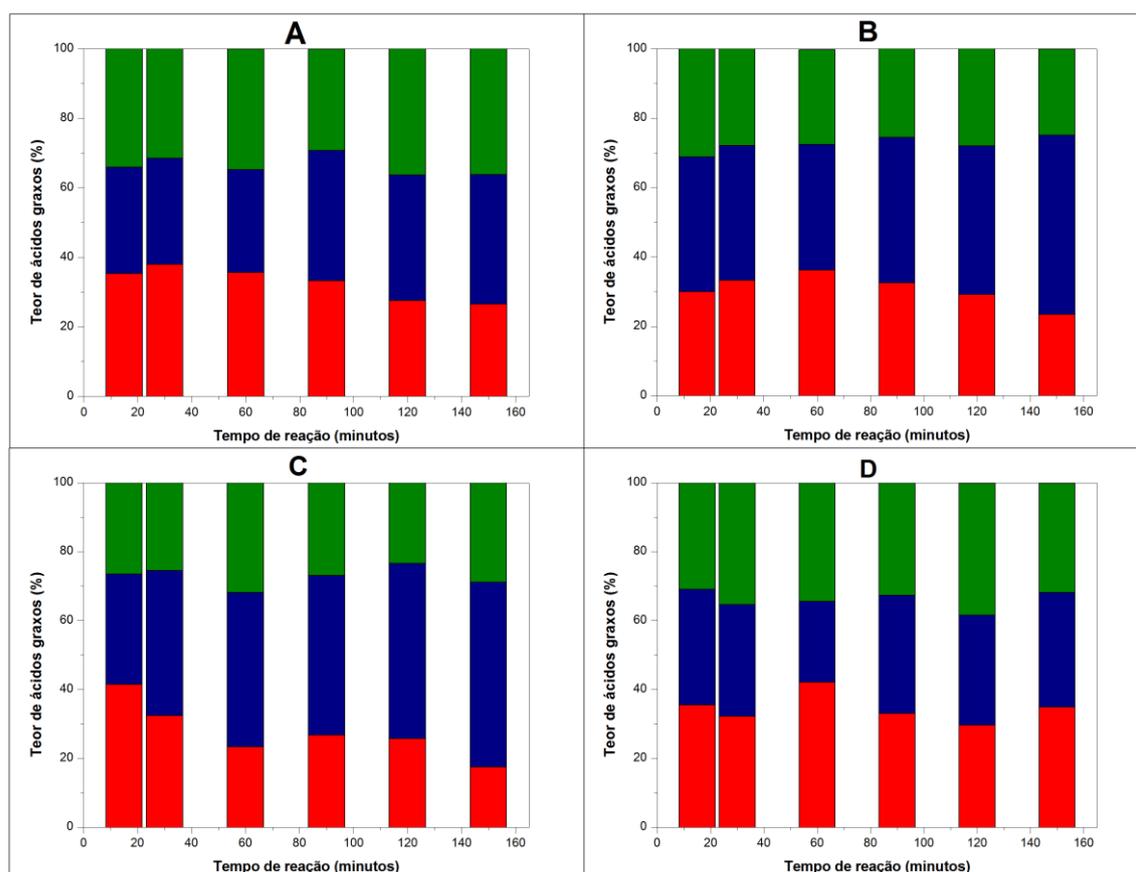


Figura 3 – Composição em ácidos graxos saturados (vermelho), monoinsaturados (azul) e poliinsaturados (verde) obtidos a partir da reação *in situ* utilizando clorofórmio como solvente, nas temperaturas de 45 (A), 60 (B), 75 (C) e 90 (D) °C.

### Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a potencialidade de utilização da transesterificação direta da biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* para a obtenção de ésteres etílicos, visando ao processo de produção de biocombustíveis. Os resultados também mostram que os parâmetros temperatura de reação e tipo de solvente são significativos na obtenção de rendimentos elevados em ésteres etílicos a partir da reação *in situ* da biomassa. Dessa maneira, o rendimento em ésteres etílicos mais alto pode ser obtido com a utilização do hexano como solvente, nas condições de 90 °C e 150 minutos de reação, produzindo  $137,7 \text{ mgésteres g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ . Além disso, observa-se que a composição em ácidos graxos para os ésteres etílicos obtidos, em todas as condições avaliadas, apresenta um predomínio de componentes insaturados, que tendem a permanecer acima de 70%, sendo, portanto, a presença de componentes saturados de

menor contribuição. Essa composição é uma boa característica para a produção de biodiesel, já que tende a ser a mais adequada para regiões com temperaturas mais baixas, pois evita problemas de entupimento nos bicos causados pelos ácidos graxos saturados.

### **Agradecimentos**

À SANEPAR pelo fornecimento de efluente de digestor anaeróbio.

À Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) – RJ que cedeu a cepa da microalga utilizada neste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

### **Referências**

BAÜMGARTNER, T. R. da S., BURAK, J. A. M., BAÜMGARTNER, D., ZANIN, G. M., ARROYO, P. A. Biomass production and ester synthesis by *in situ* transesterification/esterification using the microalgae *Spirulina platensis*. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, 1-7, 2013.

BRANCO, K. B. Z. F., TREVISAN, E., REIS, N. V. dos, ARROYO, P. A. Purificação e caracterização do óleo da microalga *Scenedesmus accuminatus* visando à produção de biodiesel. **Anais XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2014.

CARVALHO Jr., R. M., VARGAS, J. V. C., RAMOS, L. P., MARINO, C. E. B., TORRES, J. C. L. Microalgae biodiesel via *in situ* methanolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. 86, p. 1418-1427, 2011.

CAVALCANTI, V. F., LEAL, B. E. S., PRADO, M. R., SAKUMA, A. C., PEGORARO, L. A., RAMOS, L. P. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de placas planas e produção de ésteres por transesterificação *in situ*. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, p. 224-254, 2014.

GAURAV, N., SIVASANKARI, S., KIRAN, G., NINAWA, A., SELVIN, J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 73, 205-214, 2017.

ISLABÃO, C. A., MENDES, C. R. B., RUSSO, A. D. P. G., ODEBRECHT, C. Effects of irradiance on growth, pigment content and photosynthetic efficiency on three peridinin-containing dinoflagellates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 485, 73-82, 2016.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P., Manual do Biodiesel. Editora Edgard Blücher, São Paulo-SP, 2006.

LEWIS, T., NICHOLS, P. D., McMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods of recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, n. 43, p. 107-116, 2000.

McGINN, P. J., DICKINSON, K. E., BHATTI, S., FRIGON, J., GUIOT, S. R., O'LEARY, S. J. B. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. **Photosynthesis Research**, n. 109, p. 231-247, 2011.

MIAO, X., WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, n. 97, p. 841-846, 2006.

OEHL, L. L., HANSEN, A. P., ROHRER, C. A., FENNER, G. P., BOYD, L. C. Oxidation of phytosterols in a test food system. **JAACS**, v. 78, n. 11, 2001.

SMEDES, F., ASKLAND, T. K. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 3, 193-201, 1999.

SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography**, n. 92, 223-230, 1974.

TAVARES, G. R., MASSA, T. B., GONÇALVES, J. E., SILVA, C., SANTOS, W. D. Assesment of ultrasound-assisted extraction of crambe seed oil for biodiesel synthesis by *in situ* interesterification. **Renewable Energy**, n. 111, p. 659-665, 2017.

VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B. Ácidos Graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação, Varela, São Paulo-SP, 2006.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**. v. 35, n. 2, 274-279, 2012.

WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M., SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 2724-2730, 2011.

WIDJAJA, A., CHIEN, C., JU, Y. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, n. 40, 13-20, 2009.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the institute of applied microbiology, University of Tokyo. **Journal Gen. Appl. Microbiology**, n. 6, v. 4, 283-292, 1960.