

Produção de biodiesel por transesterificação enzimática *in situ* em solvente orgânico a partir da biomassa de *Desmodesmus sp.*

Danielle Kochenborger John¹

Martiele Bizarro da Silva²

Michele Hoeltz³

Adilson Ben da Costa⁴

Rosana de Cássia de Souza Schneider⁵

RESUMO

Um dos materiais alternativos mais investigados atualmente para a produção de biodiesel são as microalgas. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do método de transesterificação enzimática *in situ* da microalga *Desmodesmus sp.* em solvente orgânico, acompanhando a reação através do monitoramento *on-line* com sonda de infravermelho e cromatografia gasosa. Dois ensaios foram realizados em condições distintas para efeito comparativo. Baseado nos resultados obtidos por espectroscopia e cromatografia, bem como nas propriedades calculadas a partir do perfil cromatográfico, pode-se concluir que é possível à produção de biodiesel *in situ* a partir de biomassa de microalgas, reduzindo a etapa de extração de óleo.

Palavras-chave: Microalga. *Desmodesmus sp.* Biodiesel. Transesterificação *in situ*. Espectroscopia de infravermelho. Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

One of the most investigated alternative materials for the production of biodiesel is microalgae. The present work had the objective of evaluating the *in situ* enzymatic transesterification method using the microalga *Desmodesmus sp.* in organic solvent, following the reaction through online monitoring with infrared spectroscopy and gas chromatography. Two experiments were carried out under different conditions for comparative effect. Based on the results obtained by spectroscopy and chromatography, as well as the properties calculated from the chromatographic profile, it can be concluded that it is possible to produce *in situ* biodiesel from microalgae biomass, eliminating the oil extraction step.

Keywords: Microalgae. *Desmodesmus sp.* Biodiesel. *in situ* Transesterification. Infrared spectroscopy. Gas chromatography.

¹Aluna do Curso de Química Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul.

²Aluna do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade de Santa Cruz do Sul.

³Professora do Departamento de Biologia e Farmácia e Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental na Universidade de Santa Cruz do Sul.

⁴Professor do Departamento de Biologia e Farmácia e Programa de Pós-graduação em Sistemas e Processos Industriais na Universidade de Santa Cruz do Sul.

⁵Professora do Departamento de Química e Física e Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental na Universidade de Santa Cruz do Sul. <rosana@unisc.br>

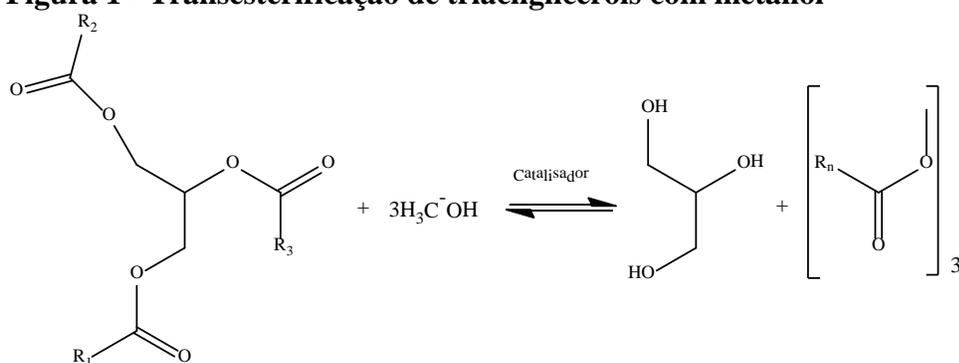
1 INTRODUÇÃO

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos simples e de grande importância no equilíbrio de sistemas aquáticos. Podem se adaptar a diversos ambientes e suportar mudanças de temperatura e composição do meio, incidência de radiações e anaerobiose. As microalgas, pela extensa variedade de espécies e propriedades intrínsecas, demonstram grande potencial para exploração comercial. Dentre os principais componentes de suas células, destaca-se seu teor de lipídios, que é matéria prima para a produção de biodiesel (CAMPANELLA et al., 2001, MALLICK, 2002; CHISTI, 2007; AMARO et al., 2012).

A preocupação com o aumento de lançamento de CO₂ e outros poluentes na atmosfera é um assunto premente. Conforme Singh et al. (2014) o crescimento de 2% ao ano de energia para transporte pode conduzir a 80% mais emissões de gases de efeito estufa em comparação aos níveis de 2002.

Novas estratégias para a substituição das energias fósseis necessitam ser constantemente desenvolvidas. Fontes renováveis como energia solar, eólica, geotérmica e a partir de biomassa vegetal têm a capacidade de prover alternativas para uma energia mais limpa (SINGH et al., 2014). Segundo Beer et al. (2011), o consumo de combustíveis renováveis tem impacto ambiental reconhecidamente menor. O óleo diesel, um combustível fóssil responsável por boa parte da emissão dos gases responsáveis pelo efeito estufa, pode ser em parte substituído pelo uso de biodiesel de diversas culturas, entre elas as microalgas.

O biodiesel consiste na conversão de triacilgliceróis (TAG) por transesterificação, onde TAG reagem com álcoois, na presença de um catalisador, para a formação de ésteres alquílicos de ácidos graxos (EMAG) (HOEKMAN et al., 2012), como ilustrado na Figura 1. As vantagens do biodiesel sobre o diesel derivado do petróleo incluem uso de matéria prima renovável, aumento da capacidade de lubrificação, biodegradabilidade, menor toxicidade e redução na emissão de monóxido de carbono (CO) (LEE et al., 2010).

Figura 1 - Transesterificação de triacilgliceróis com metanol

Fonte: Hoekman et al., 2012

Os métodos tradicionais de produção de biodiesel partem da conversão de óleos vegetais de plantas superiores oleaginosas. Para o emprego de microalgas como matéria-prima, a produção de biodiesel requer duas etapas para a obtenção dos ésteres metílicos: (1) extração de lipídios e (2) transesterificação. Como alternativa, a etapa de extração pode ser eliminada realizando a reação diretamente no conteúdo lipídico contido na biomassa, em um processo conhecido como transesterificação *in situ*.

Metodologias que fazem uso de técnicas de transesterificação *in situ* se tornam alternativas para a eliminação das limitações e perdas sofridas pelos processos convencionais de extração e conversão, integrando estas etapas e reduzindo custos (DONG et al., 2013). Velasquez-Orta et al. (2012) alcançaram 77,6% de conversão em biodiesel com catalisador alcalino partindo de biomassa de *Chlorella vulgaris* como fonte de lipídios, combinando as etapas de extração e transesterificação.

A combinação da transesterificação *in situ* a um catalisador enzimático é outra maneira de aprimorar a produção de biodiesel. A utilização de enzimas é capaz de atingir alta conversão, com rendimentos entre 86-96%. Catalisadores enzimáticos são seletivos, específicos e ambientalmente menos impactantes, acarretando na diminuição da formação de coprodutos durante a reação e na sua reutilização (GO et al., 2016). Guldhe et al. (2016) obtiveram conversão à EMAG dos lipídios da microalga *Scenedesmus obliquus* de 90,82%, utilizando lipase imobilizada do *Aspergillus niger* e adição de metanol em etapas. Esta técnica possui vários pontos fortes em relação ao uso de outros catalisadores, principalmente a baixa quantidade de resíduos e custo de energia, pois pode ser realizada em temperaturas ambientes.

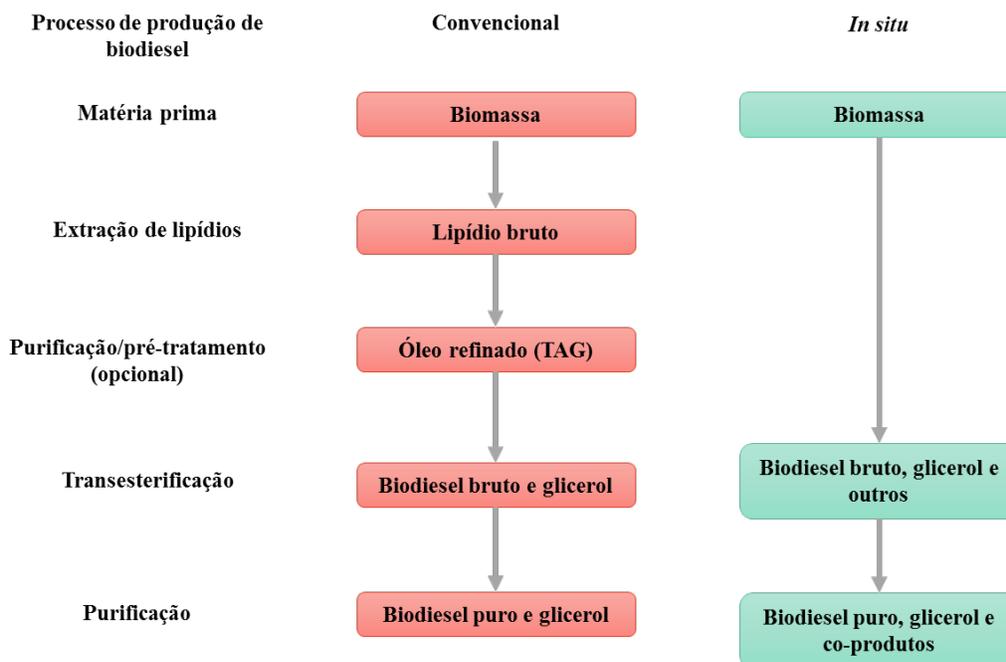
O monitoramento da conversão de TAG em biodiesel nas reações *in situ* é um desafio, uma vez que a ruptura celular pode liberar mais compostos, além de óleo que será convertido em éster. Os principais métodos para acompanhamentos são cromatografia gasosa (CG) (KEERA et al., 2011), análises termogravimétricas (TGA) (SOUSA et al., 2013) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (LI et al., 2001). Os processos instrumentais de análise de biodiesel são lentos, com preços elevados, exigindo operadores altamente qualificados e não são facilmente adaptados ao monitoramento *on-line* (MUELLER et al., 2013). O desenvolvimento da espectroscopia por infravermelho tem proporcionado a obtenção informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra de interesse de uma maneira mais avançada e menos destrutiva (ZHANG, 2012), ou mesmo direto no meio reacional sem alterar os resultados e identificando modificações durante toda a reação (OLIVEIRA et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção do biodiesel a partir da biomassa da microalga *Desmodesmus sp.*, através do método de transesterificação enzimática *in situ* utilizando solvente orgânico como meio reacional, acompanhando a biotransformação através de espectrometria no infravermelho e cromatografia gasosa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados visando à comparação de dois métodos de produção de biodiesel de microalgas, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Diagrama comparativo entre as principais etapas nos processos de produção de biodiesel convencional e *in situ*



Fonte: O Autor

2.1 Cultivo da microalga

A cepa da microalga *Desmodesmus sp.* foi obtida no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de Santa Cruz do Sul. Inicialmente foi aclimatada em meio contendo nitrogênio, fósforo e potássio (N:P:K, 18:6:18 m/m) a 3 g L⁻¹. Este pré-inóculo foi transferido para um fotobiorreator tubular tipo coluna de bolhas (GRESSLER et al., 2014), onde repiques semanais foram realizados para manutenção da cultura. O sistema foi mantido à temperatura constante de 25°C e iluminação contínua com lâmpadas de 20W. Para o acompanhamento do crescimento da microalga foi utilizado o método de Chiu et al. (2008). A densidade celular foi obtida através da construção de uma curva analítica, medindo sua absorvância em espectrofotômetro UV-vis Q798U (Quimis[®]) a 682 nm. A amostra foi diluída para que se obtivesse valores de absorvância entre 0,1 e 1,0. O monitoramento foi realizado para observação do crescimento e manutenção do cultivo.

2.2 Separação da biomassa e rendimento de massa seca

A biomassa foi separada por centrifugação, utilizando centrífuga (6-16 KS Sigma[®]), em 3600 rpm, por 20 minutos, à 20 °C. Posteriormente, a biomassa colhida foi congelada, liofilizada (liofilizador K120 Liotop[®]) e armazenada.

2.3 Determinação de teor de clorofila e carotenoides

As concentrações de clorofila e carotenoides foram determinadas pelo método de Lichtenthaler (1987), utilizando acetona 80% (v/v) para a extração e leitura da absorbância da solução em diferentes comprimentos de onda em espectrofotômetro UV/visível (Q798U - Quimis[®]). A determinação dos pigmentos foi realizada a partir das equações 1 a 3.

$$C_a = 12,25A_{663} - 2,79A_{647} \quad (1)$$

$$C_b = 21,50A_{647} - 2,79A_{663} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides} = 1000A_{470} + 1,82C_a + \frac{85,02C_b}{198} \quad (3)$$

Onde A é a absorbância medida nos respectivos comprimentos de onda, C_a é o teor de Clorofila a e C_b é o teor de Clorofila b. Os valores encontrados em µg mL⁻¹ de extrato, foram convertidos à µg g⁻¹ de biomassa seca.

2.4 Determinação de lipídios e extração de óleo da biomassa

Para a quantificação de lipídios foi utilizado o método adaptado de Bligh e Dyer (1959). Foram adicionados 6 mL da mistura clorofórmio e metanol (1:2 v/v) à 100 mg de biomassa liofilizada. A amostra foi sonicada (ECO-SONICS Q 1.8/25[®]) por 30 minutos e levada ao freezer por 4 horas. Após, foi novamente sonicada por 30 minutos e centrifugada por 20 minutos (centrífuga refrigerada 6-16 KS Sigma[®]) à 2000 rpm e 15 °C. O sobrenadante foi recuperado em novo frasco, ao qual foram adicionados 4 mL de água deionizada e 2 mL de clorofórmio e levada a centrifugação até sedimentação. A fase orgânica contendo os lipídios foi transferida ao frasco pré-pesado. O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio.

2.5 Derivatização do óleo extraído da biomassa

Em um balão de fundo redondo, ao óleo extraído pelo método de extração de lipídios adaptado de Bligh e Dyer (1959), foram adicionados 6,0 mL de uma solução metanólica de NaOH 2% e aqueceu-se sob refluxo por 20 minutos. Adicionou-se, gota a gota, 7 mL de solução

BF₃/Metanol. Após 4 minutos, 5 mL de heptano foram acrescentados e deixou-se a amostra em refluxo por 2 minutos. Posteriormente, o balão foi retirado do aquecimento e resfriado a temperatura ambiente. Uma solução saturada de NaCl foi acrescida e agitada suavemente até a observação de duas fases. Transferiu-se para um tubo de ensaio e a fase superior foi separada para a adição de Na₂SO₄ anidro. A parte líquida foi retirada e armazenada para posterior análise cromatográfica.

2.6 Composição centesimal

Os teores de umidade, cinzas, proteínas, fibras e carboidratos foram determinados na biomassa inicial seguindo os procedimentos elaborados pelos Métodos Oficiais de Análise - AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990).

2.7 Transesterificação enzimática *in situ*

As reações foram realizadas partindo da biomassa liofilizada e do óleo extraído, utilizado como referência. O óleo foi extraído da biomassa a partir do método Bligh Dyer (1959) modificado para extração de óleo a partir de uma massa maior de biomassa, com 4 gramas. Lipase imobilizada em resina acrílica Novozym[®] 435 foi usada como catalisador, na concentração de 10% em relação os respectivos pesos de biomassa e óleo. Os ensaios foram acompanhados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR – FTIR) através da sonda ReactIR 15 (Mettler Toledo[®]).

2.8 Métodos de acompanhamento da transesterificação

2.8.1 Espectroscopia no Infravermelho

Conforme descrito no item 2.7, as reações foram monitoradas com a sonda ReactIR 15 (Mettler Toledo[®]) também foram obtidos os espectros da biomassa, dos padrões dos solventes hexano, metanol, água, do óleo extraído e do óleo derivatizado. O espectro da biomassa foi obtido através da elaboração de um filme sobre a superfície de leitura da sonda de infravermelho.

A faixa espectral coletada foi de 650 a 2500 cm⁻¹, com resolução de 8 cm⁻¹ e 256 varreduras e as leituras foram realizadas automaticamente a cada 5 minutos de reação, por 48 horas.

2.8.2 Cromatografia gasosa

A análise quantitativa foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC) em um equipamento Shimadzu[®] QP 2010 Plus equipado com Injetor Automático AOC 20i, sendo as amostras separadas em uma coluna capilar Zbwax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O hélio (White Martins Gases Industriais, Canoas, Brasil, 99,999%) foi utilizado como gás de arraste e a sua taxa de fluxo foi de 1 mL min^{-1} . A programação de temperatura do forno foi 70°C, 4 °C min^{-1} , até 240 °C, 5 °C min^{-1} , até 250°C, totalizando 49,5 minutos de análise. Temperatura do detector 300 °C, temperatura do injetor 250 °C, operado no modo “split” 1:1 e volume de injeção de 1 μL . A identificação dos compostos presentes foi efetuada pela comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais de ésteres metílicos (Supelco Analytical[®] - Bellefonte, Pennsylvania, USA).

Após a análise cromatográfica, as propriedades do biodiesel foram estimadas utilizando “Biodiesel Analyzer[®] Ver. 1.1” (disponível em <http://www.brteam.ir/biodieselanalyzer>).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de biomassa

3.1.1 Rendimento da biomassa liofilizada

Após centrifugada e liofilizada, o rendimento de biomassa seca da microalga *Desmodesmus* sp. foi de $508,96 \pm 105,97 \text{ mg L}^{-1}$. O valor obtido foi superior ao encontrado por Gressler et al. (2014) que, utilizando efluente da Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade de Santa Cruz do Sul (ETE-UNISC) como meio de cultivo, obteve $234,00 \text{ mg L}^{-1} \pm 91,89 \text{ mg L}^{-1}$ para a mesma microalga. O mesmo estudo observou que o aporte de CO_2 , nos parâmetros estabelecidos, pode aumentar a produção de biomassa microalgal para $1277,44 \pm 1053,04 \text{ mg L}^{-1}$. Incrementos no meio de cultivo no qual a microalga foi cultivada podem melhorar seu rendimento em biomassa e conteúdo lipídico.

3.1.2 Caracterização da biomassa

Produção de lipídios é um dos principais focos para o uso de microalgas como alternativa para a produção de biocombustíveis. A fração lipídica média da biomassa foi de $8,21 \pm 0,62\%$ para o cultivo em N:P:K, como mostra a Tabela 1. Microalgas podem apresentar entre 1% e 70% de conteúdo lipídico, embora a maioria das espécies não ultrapasse de 40%, e sua composição

varie de acordo com a espécie, constituição genética e meio de cultivo (ZMORA; RICHMOND, 2004; VIJAYARAGHAVAN; HEMANATHAN, 2009).

Tabela 1 - Composição centesimal da biomassa seca da microalga *Desmodesmus sp.* cultivada em fotobiorreator com N:P:K como meio de cultivo

Composição centesimal	Valor em biomassa seca de <i>Desmodesmus sp.</i> (%)
Umidade	1,74±0,04
Proteínas	33,91±0,39
Cinzas	17,46±2,17
Lipídios	8,21±0,62
Fibras	21,40±4,20
Carboidratos	17,27±2,60

Fonte: O Autor.

A biomassa apresentou $17,27 \pm 2,60\%$ de carboidratos, que são constituintes da parede celular da microalga, como celulose, pectina ou polissacarídeos. Estes componentes variam de acordo com a espécie e também são acumulados como reserva de energia nos plastídios, na forma de amido, podendo chegar até 60% em algumas espécies. O acúmulo de carboidratos aumenta devido à limitação de nutrientes no meio. A espécie *Chlorella vulgaris* é considerada uma das principais fontes de carboidratos, principalmente de açúcares fermentescíveis, responsáveis pela produção de bioetanol (CHEN et al., 2013). O teor de fibras ($21,40 \pm 4,20\%$) pode indicar nível de celulose, uma fibra insolúvel que, juntamente com os carboidratos, pode ser convertido em açúcares de cadeia menores através de hidrólise (KIM; KIM, 2013). Outros componentes como as proteínas, podem ser utilizados para nutrição humana e animal, sendo que em algumas espécies, como a *Spirulina máxima*, podem chegar a 70% do conteúdo da biomassa seca e não costumam ser utilizadas para a produção de biocombustíveis (HARUN et al., 2010). Já as cinzas indicam o total de componentes inorgânicos presentes na biomassa, ficando acima do encontrado na literatura, onde, para a espécie *Desmodesmus communis*, em diferentes meios de cultivo, obteve-se valores entre 3 e 13,3% (SAMORÌ et al., 2013).

A composição total das microalgas pode também conter ceras, esteróis, terpenos, quinonas e pigmentos (JUNEJA et al., 2013). Dentre os principais componentes corantes estão as clorofilas, que possuem atividade quelante, podendo ser utilizadas na área farmacêutica, pois aumentam o nível de crescimento celular, acelerando a cicatrização, além de ser utilizada na indústria alimentícia como corante, devido a intensidade de sua coloração verde (HARUN et al., 2010).

Os carotenoides são substâncias encontradas em diversas plantas superiores e algas, assim como em organismos não fotossintéticos e são responsáveis pela coloração avermelhada. Nas algas, os mesmos possuem atividade essencial na realização de fotossíntese, juntamente com a clorofila, mantendo a estrutura e funções de complexos fotossintéticos. Possuem ação antioxidante, protegendo estes micro-organismos contra o estresse oxidativo (DEL CAMPO et al., 2007). A Tabela 2 apresenta os teores de clorofilas e carotenoides da biomassa da microalga *Desmodesmus* sp.

Devido à procura por corantes naturais nas indústrias alimentícia e cosmética, estudos propõem métodos de aumentar a produtividade de determinados pigmentos através da modificação de meios de cultivo das microalgas produtoras de corantes. Os valores encontrados de clorofila totais foram considerados abaixo dos encontrados em outras espécies de algas verdes, como a *Chlorella pyrenoidosa*, que possuem percentual de clorofila entre 0,01 e 6,00% (Hodaifa et al., 2008). Hu et al. (2013), utilizando um meio altamente salino e iluminação para a microalga *Coelastrella* sp. F50, conseguiram diminuir o tempo de produção de carotenoides de um mês para doze dias. Utilizando a microalga *Spirulina platensis* em um meio com ureia como fonte de nitrogênio, foi possível aumentar a quantidade de clorofila produzida, na busca de fontes não-vegetais deste corante (DE OLIVEIRA RANGEL-YAGUI et al., 2004).

Tabela 2 - Teor de Carotenoides e Clorofilas a, b e totais da microalga *Desmodesmus* sp. em $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa seca

Pigmento	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Clorofila <i>a</i>	220,67±54,27
Clorofila <i>b</i>	84,40±13,78
Clorofilas totais	297,74±69,69
Carotenoides	47,36±13,31

Fonte: O Autor

3.2 Transesterificação Enzimática

3.2.1 Espectroscopia no Infravermelho

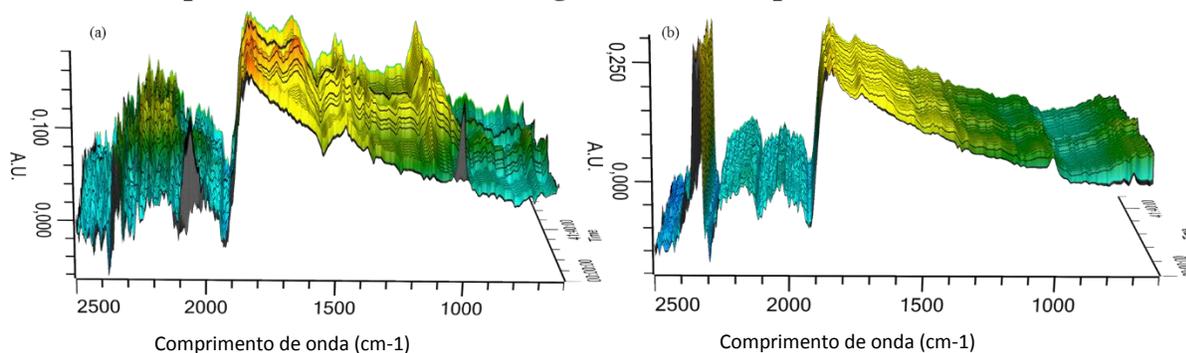
As diferentes reações de transesterificação foram monitoradas em tempo real coletando espectros no infravermelho por ATR-FTIR. Para cada reação, foi obtido um conjunto de 576 espectros, que puderam ser plotados, formando um gráfico tridimensional (Figura 3), sendo

monitorada a mudança de intensidade na região de 1300 - 1100 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação C-O nos ésteres, e a região de 1750 - 1725 cm^{-1} característica tanto dos ésteres metílicos quanto dos TAG. Outras regiões também foram observadas para a caracterização, conforme a Tabela 3. As análises cromatográficas foram realizadas nas amostras de forma que os ésteres metílicos fossem quantificados, através da detecção por ionização em chama (CG-DIC).

O ensaio *in situ* apresentou aumento de intensidade das bandas, comumente atribuídas aos ésteres depois de 15h de reação. Após 34h, puderam ser observadas variações de intensidade nas bandas 1656 cm^{-1} e 1134 cm^{-1} . Estas mudanças sugerem o consumo do componente anteriormente liberado no meio. As mesmas bandas sofrem aumento de absorção de energia na região do IV e, por esta região também indicar presença de ésteres, mostrou a biotransformação dos ácidos graxos na transesterificação.

Acrescenta-se que o emprego do monitoramento da reação por infravermelho permitiu identificar que a reação alcançou o equilíbrio químico. Pode-se acompanhar a mudança de intensidade da banda de estiramento C-O, atribuída aos ésteres na região de 1300-1100 cm^{-1} durante as 10 primeiras horas de reação, observado na Figura 4. Verificou-se, portanto que há uma mudança tanto no ensaio *in situ*, utilizando a biomassa, que pode ser relacionada à liberação do conteúdo lipídico ao meio reacional, quanto no ensaio utilizando o óleo extraído, indicando o consumo de material no meio e sua biotransformação.

Figura 3 - Conjunto de espectros coletados durante o processo de transesterificação enzimática a partir da biomassa microalgal (a) e do óleo previamente extraído (b)

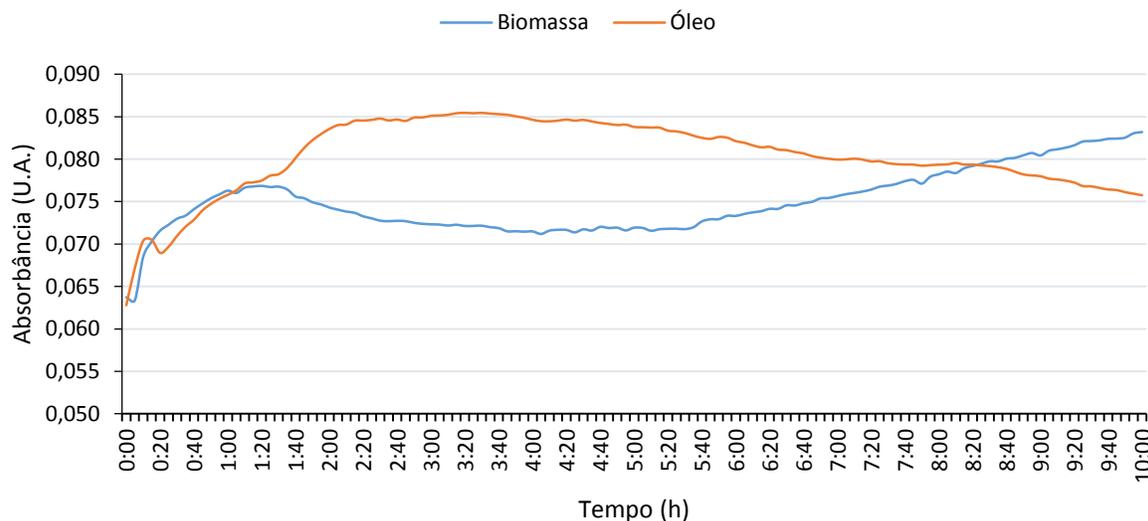


Fonte: O Autor.

Tabela 3 - Principais bandas de absorção de microalgas no IV

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Classe do composto associado	Referência
~ 1750 - 1725	estiramento C=O	ésteres, lipídios	(Mayers et al., 2013)
~ 1655	estiramento C=O	proteínas	
~ 1545	deformação N-H, estiramento C-N	proteínas	
~ 1390	deformação CH ₂ , deformação CH ₃	grupos metil e metileno	(de Souza e Cajaiba da Silva, 2012)
1300-1100	estiramento C-O	ésteres	
~ 1240	estiramento P=O	fosfodiésteres e fosfolipídios	(Mayers et al., 2013)
1200-900	estiramento C-O-C	polissacarídeos	(Golterman, 1975)
~ 700-400	-	clorofilas, carotenoides, outros pigmentos	

Fonte: O Autor.

Figura 4 - Comparação da mudança de intensidade da banda de estiramento C-O na região de 1300-1100 cm⁻¹

Fonte: O Autor.

Este resultado é importante para indicar que o conteúdo lipídico, ao ser extraído como TAG ou sendo extraído diretamente da célula com transformação *in situ* dos TAG em EMAG, apresenta comportamento similar com relação à reação propriamente dita. A diferença é que nos experimentos *in situ*, algumas modificações observadas nos espectros ao longo do tempo de

observação, podem estar relacionadas à lise de outras moléculas no meio reacional, provenientes da fase não lipídica da biomassa.

3.2.1 Cromatografia gasosa

As análises cromatográficas dos ensaios realizados apresentam o perfil cromatográfico de EMAG característico. *Desmodemus* sp. possui majoritariamente em sua composição lipídica, os ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) e α -linolênico (C18:3), podendo chegar até 18,73 % do peso de sua biomassa seca na produção com suporte de CO₂ (GRESSLER et al., 2014).

As reações de transesterificação apresentaram ésteres saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. O grau de saturação dos EMAGs afeta diretamente a qualidade do biodiesel. Uma quantidade elevada de EMAGs poli-insaturados impacta positivamente nas propriedades de escoamento do biocombustível, especialmente em ambientes de baixa temperatura, mas pode afetar negativamente sua estabilidade oxidativa. EMAGs saturados possuem excelentes propriedades de combustão, porém podem causar problemas de fluxo em temperaturas baixas (D'ALESSANDRO e ANTONIOSI FILHO, 2016).

Os ensaios realizados exibiram altos teores de EMAG insaturados, como mostra a Tabela 4. Destaca-se o conteúdo de C18:1 (ácido oleico), o qual apresenta um balanço nas suas propriedades combustíveis, o que inclui ponto de entupimento de filtro a frio, calor de combustão, viscosidade e estabilidade oxidativa, que são determinadas pela sua estrutura (LEE et al., 2010).

A composição da biomassa varia muito com relação à espécie de microalga utilizada, e, portanto, o ácido oleico é um dos componentes que varia visivelmente influenciando diretamente na indicação da microalga para biodiesel. Navarro López et al. (2016) com a microalga *Nannochloropsis gaditana* como fonte lipídica e utilizando *Novozym 435* como catalisador em uma reação *in situ* obtiveram 4,6 % de C18:1, porém um valor superior de EMAGs de cadeias longas e poli-insaturados, como o C20:4 (7,3%) e C20:5 (30,3). Com a microalga *Desmodemus brasiliensis*, Nascimento et al. (2013) obtiveram 42,42 % de ácido oleico extraído da biomassa.

Tabela 4 - Proporção relativa (%) a área total de ésteres identificados nos cromatogramas dos EMAGs encontrados por GC-DIC, para amostras dos dois métodos de transesterificação estudados.

	Óleo derivatizado	<i>In situ</i>		Método tradicional	
		Média (%)	Desvio padrão (%)	Média (%)	Desvio padrão (%)
C10:0	0,00	2,30	1,10	0,24	0,34
C12:0	0,00	1,36	0,97	1,94	1,38
C14:0	1,67	1,94	1,41	6,17	1,16
C14:1	0,00	2,19	1,61	0,69	0,97
C16:0	4,72	2,78	0,44	3,70	1,69
C16:1	4,72	1,10	0,78	2,55	2,40
C18:0	0,00	1,28	1,81	6,37	3,39
C18:1 ^a	0,28	2,64	3,73	2,45	1,77
C18:1 ^a	0,00	0,84	1,19	1,89	2,67
C18:1 ^a	2,06	11,42	4,75	5,16	4,80
C18:1 ^a	0,00	2,64	3,73	0,00	0,00
C18:2	2,40	5,36	4,59	6,34	5,53
C18:3	38,24	5,12	1,14	13,48	9,33
C20:0	38,24	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1	7,19	2,44	3,45	2,82	3,99
C20:4n-6	0,49	7,18	5,25	2,48	3,51
C22:0	0,00	6,25	8,84	5,88	8,31
C22:6n-3	0,00	1,42	2,01	0,00	0,00
C24:0	0,00	41,72	11,11	37,35	13,47
C24:1	0,00	0,00	0,00	0,50	0,70

^a isômero

Fonte: O Autor.

Assim, com base na composição de ácidos graxos do biodiesel é possível prever as propriedades que atestam a qualidade do mesmo. Estas propriedades podem ser definidas pela estrutura molecular dos EMAGs e variam de acordo com o tamanho da cadeia e número ou posição de ligações duplas (NASCIMENTO et al., 2013). Dentre os parâmetros que possuem maior influência destacam-se o número de cetanos, índice de saponificação, índice de iodo, ponto de entupimento de filtro a frio e viscosidade entre todas as propriedades calculadas a partir da composição dos EMAGs, encontrados na Tabela 5.

O índice de iodo (II) mede o grau de instauração do combustível e aumenta proporcionalmente ao número de ligações duplas. Um alto II indica baixa estabilidade química, pois há um maior número de grupos reativos na molécula, aumentando a possibilidade de oxidação e formação de depósitos. Na Europa, os valores máximos estabelecidos para biodiesel são 120 g I₂ 100 g⁻¹ (NASCIMENTO et al., 2013). Os ensaios que apresentaram valores baixos, 73,14 g I₂ 100 g⁻¹ *in situ* e 70,38 g I₂ 100 g⁻¹ a partir do óleo extraído são semelhantes ao de Song et al. (2013), que, utilizando a espécie *Scenedesmus obliquus*, obtiveram II de 70,3 g I₂ 100 g⁻¹.

O número de cetanos (NC) indica o tempo de atraso da ignição do combustível. Quanto maior seu valor, mais curto o tempo de ignição. Cadeias de ésteres metílicos muito longas aumentam a viscosidade e densidade do biodiesel, o que irá diminuir com o aumento de ligações duplas em sua estrutura. Os ensaios realizados superam os padrões europeus estabelecidos de NC mínimo de 51 (NASCIMENTO et al., 2013). Talebi et al. (2013), utilizando a cepa de *Amphora* sp., obtiveram biodiesel com NC de 62,33. O alto valor da estabilidade oxidativa do ensaio *in situ* comparado com o tradicional deve-se ao fato de que TAGs, ao serem extraídos, já começam a sofrer oxidação, o que não ocorre com os TAG no meio *in situ*, uma vez que a fração lipídica somente foi liberada durante a reação, possuindo uma degradação menor em contato com o oxigênio.

Os ésteres encontrados no biodiesel produzido a partir de *Desmodemus* sp. possuem longas cadeias. Em relação ao PEFF, quanto maior a cadeia carbônica ou o grau de saturação do biodiesel, pior suas propriedades de temperatura, embora este parâmetro possa ser corrigido com o uso de aditivos (NASCIMENTO et al., 2013).

Tabela 5 - Propriedades estimadas do biodiesel produzido nos diferentes ensaios

Propriedades	Transesterificação <i>In situ</i>	Transesterificação do óleo
AGS	57,63	61,63
AGMI	21,08	15,35
AGPI	19,08	22,3
GI	59,24	59,95
VS	176,51	182,92
II	73,14	70,38
NC	60,77	60,3
FCSL	93,73	87,04
PEFF	227,99	256,98
PN	-3,53	-3,05
PAE	67,14	56,57
PBAE	37,06	38,26
EO	13,84	8,54
MVA	39,34	39,83
VC	1,67	1,65
ρ	0,85	0,86

AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poli-insaturados; GI = grau de instauração; VS = valor de saponificação (em mg de KOH necessários para saponificar 1 g de óleo); II = índice de iodo (em g I₂ 100 g⁻¹); NC = número de cetanos; FCLS = fator de cadeia saturada longa; PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio (em °C); PN = ponto nuvem (em °C); PAE = posição alílica equivalente; PBAE = posição bis-alílica equivalente; EO = estabilidade oxidativa (em horas); MVA = maior valor de aquecimento; VC = viscosidade cinemática (em mm² s⁻¹); ρ = densidade (g cm⁻³)

Fonte: O Autor

Um parâmetro que ficou abaixo do estabelecido por órgãos internacionais é a viscosidade cinemática, sendo que no padrão americano o biodiesel deve ser caracterizado com uma viscosidade entre 1,9 e 6,0 mm² s⁻¹ (KNOTHE e STEIDLEY, 2005). A viscosidade dos combustíveis afeta a ignição, a pressão de injeção/pulverização de combustível, influenciando o desempenho do motor, a combustão e emissões de escape.

4 CONCLUSÃO

O método de transesterificação enzimática *in situ* a partir de biomassa de *Desmodesmus* sp. em meio reacional com solvente orgânico foi possível. Apresenta como produto um biodiesel com perfil similar ao obtido pelo método enzimático tradicional partindo da fração lipídica extraída. O emprego do monitoramento da reação por infravermelho permitiu identificar que a reação alcançou o equilíbrio químico após duas horas e entender que a extração na forma de ésteres metílicos diretamente da célula da microalga, havia se esgotado. A extração dos lipídios empregando o método enzimático, conforme desenvolvido neste trabalho, pode levar a melhorias do processo com relação aos impactos ambientais e financeiros, uma vez que foi reduzida uma etapa. Estes impactos devem ser avaliados no futuro, bem como, comparar a transesterificação *in situ* enzimática com a química, buscando determinar o grau de conversão em relação ao tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica e pela bolsa produtividade (309652/2016-2), ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (01.0144.00/2010). A Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do RS (209-2551/14-1) e ao TECNOUNISC, através do Centro de Excelência em Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

AMARO, H. M., et al. Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels? *Energy*, v. 44, n. 1, p. 158-166, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.05.006>

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, A. Official methods of analysis. *Vol. II*, 1990.

BEER, T. et al. The health impacts of ethanol blend petrol. *Energies*, v. 4, n. 2, p. 352-367, 2011. doi:[10.3390/en4020352](https://doi.org/10.3390/en4020352)

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, p. 911-917, 1959. DOI:[10.1139/o59-099](https://doi.org/10.1139/o59-099)

CAMPANELLA, L. et al. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research*, v. 35, n. 1, p. 69-76, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00223-2)

CHEN, C.-Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, v.78, p. 1-10, 2013. DOI: [10.1016/j.bej.2013.03.006](https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006)

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

CHIU, S.-Y. et al. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 9, p. 3389-3396, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.013>

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 58, p. 832-841, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>

DE OLIVEIRA RANGEL-YAGUI, C. et al. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource technology*, v. 92, n. 2, p.133-141, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.002>

DE SOUZA, A. V. A.; CAJAIBA DA SILVA, J. O. F., Biodiesel Synthesis Evaluated by Using Real-Time ATR-FTIR. *Organic Process Research & Development*, v. 17, n. 1, p. 127-132, 2012. DOI: [10.1021/op300318k](https://doi.org/10.1021/op300318k)

DEL CAMPO, J. A. et al. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007. DOI:[10.1007/s00253-007-0844-9](https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9)

DONG, T. et al. Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. *Bioresource technology*, v. 136, p. 8-15, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.105>

GO, A. W. et al. Developments in in-situ (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 60, p. 284-305, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.070>

GOLTERMAN, H. L. Algae and their Pigments. *Developments in Water Science*, v. 2, p. 233-247, 1975. [https://doi.org/10.1016/S0167-5648\(08\)71070-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5648(08)71070-0)

GRESSLER, P. et al. Cultivation of *Desmodesmus subspicatus* in a tubular photobioreactor for bioremediation and microalgae oil production. *Environmental technology*, v. 35, n. 2, p. 209-219, 2014. DOI: [10.1080/09593330.2013.822523](https://doi.org/10.1080/09593330.2013.822523)

GULDHE, A. et al. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. *Renewable Energy*, v. 85, p. 1002-1010, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.059>

HARUN, R., et al., Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>

HODAIFA, G., et al., Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 5, p. 1111-1117, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.020>

HOEKMAN, S. K., et al., Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 1, p. 143-169, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.143>

HU, C.-W., et al., Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food chemistry*, v. 138, n. 4, p. 2071-2078, 2013. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.11.133](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.133)

JUNEJA, A., et al., Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, v. 6, n. 9, p. 4607-4638, 2013. doi: [10.3390/en6094607](https://doi.org/10.3390/en6094607)

KEERA, S. T., et al., Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst. *Fuel*, v. 90, n. 1, p. 42-47, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.07.046>

KIM, S. e KIM, C. H., Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. *Renewable Energy*, v. 54, p. 150-155, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.08.032>

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R., Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel*, v. 84, n. 9, p. 1059-1065, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2005.01.016>

LEE, J.-Y., et al., Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 1, p. S75-S77, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>

LI, Z., et al., Analysis of fatty acids in mouse cells using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 54, n. 7, p. 463-467, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02491200>

LICHTENTHALER, H. K., Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, v. 148, n. 350-382, 1987. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

MALLICK, N., Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*, v. 15, n. 4, p. 377-390, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1020238520948>

MAYERS, J. J., et al., Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresource technology*, v. 148, p. 215-220, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.133>

MUELLER, D., et al., Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and multivariate analysis for identification of different vegetable oils used in biodiesel production. *Sensors*, v. 13, n. 4, p. 4258-4271, 2013. doi: 10.3390/s130404258

NASCIMENTO, I. A., et al., Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *BioEnergy Research*, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2>

NAVARRO LÓPEZ, E., et al., Fatty acid methyl ester production from wet microalgal biomass by lipase-catalyzed direct transesterification. *Biomass and Bioenergy*, v. 93, p. 6-12, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.018>

OLIVEIRA, A. D. D., et al., Comprehensive near infrared study of Jatropha oil esterification with ethanol for biodiesel production. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 170, p. 56-64, 2017. doi: 10.1016/j.saa.2016.07.006.

SAMORÌ, G., et al., Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*, v. 47, n. 2, p. 791-801, 2013. doi: 10.1016/j.watres.2012.11.006

SINGH, B., et al., Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable and sustainable Energy reviews*, v. 29, p. 216-245, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.067>

SONG, M., et al., Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 141, p. 245-251, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.024>

SOUSA, F. P., et al., Thermogravimetry and Viscometry for Assessing the Ester Content (FAME and FAEE). *Fuel Processing Technology*, v. 109, p. 133-140, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.09.049>

TALEBI, A. F., et al., Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, v. 2, n. 3, p. 258-267, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.003>

VELASQUEZ-ORTA, S. et al. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, v. 94, p. 544-550, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.045>

VIJAYARAGHAVAN, K.; HEMANATHAN, K. Biodiesel production from freshwater algae. *Energy & Fuels*, v. 23, n. 1, p. 5448-5453, 2009. **DOI:** 10.1021/ef9006033

ZHANG, W.-B., Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 8, p. 6048-6058, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.07.003>

ZMORA, O.; RICHMOND, A. Microalgae for Aquaculture. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 2004. DOI: 10.1002/9780470995280.ch20