

## COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS NO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO DIRETA DA BIOMASSA DE *Chlorella vulgaris* VIA ULTRASSOM

**NUNES, Camila Francine Paes<sup>1</sup>; SANTOS, Marco Aurélio Ziemann dos<sup>2</sup>;  
PACHECO, Bruna Silveira<sup>1</sup>; SINHOR, Vanderleia<sup>2</sup>; TUCHTENHAGEN, Caroline<sup>2</sup>;  
MUCHALE, Bruno Vargas<sup>2</sup>; PEREIRA, Claudio Martin Pereira<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Química Industrial -UFPEL; *Laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção LAHBBio*<sup>2</sup>; CCQFA-UFPEL. [camilinhahnunes@gmail.com](mailto:camilinhahnunes@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem se desenvolvendo um grande interesse pela utilização de microalgas para produção de biocombustíveis, pelo fato de ser uma grande fonte de matéria prima para produção de energias renováveis (TEIXEIRA, 2000). Estes tipos de energias, denominadas energias limpas, tal como os biocombustíveis, auxiliam na redução da poluição gerada principalmente por automóveis e indústrias (BILGEN et al., 2008).

Dentro da nova temática mundial, onde a bioenergia adquiriu um papel importante na ciência, à produção de biodiesel tem atingido números significativos dentro do setor produtivo. A grande capacidade das microalgas de assimilar variadas fontes de carbono de origem orgânica e inorgânicas para maior produção de lipídeos, tem despertado interesses no setor de pesquisa (LIANG et al., 2009).

Uma das técnicas que atualmente tem chamado a atenção devido a sua aplicação como alternativa sustentável na execução de reações químicas é a sonoquímica (HOBUSS, 2012). Nesta técnica ocorre o processo que chamamos de cavitação ou capacidade de criar, aumentar e explodir cavidades de vapor. A cavitação é o processo físico responsável nas reações químicas pela redução do tempo de reação, aumento considerável da conversão dos reagentes em produtos e aumento global do rendimento da reação (NEUENFELDT, 2010).

O objetivo deste trabalho consiste na comparação de resultados das metodologias modificadas da literatura para uso em ultrassom no processo de derivatização direta da biomassa de *Chlorella vulgaris*.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A extração de lipídeos da microalga *C. vulgaris* por diversos métodos modificados foram realizadas em ultrassom marca SONICS modelo VCX-500 com frequência total de 50/60Hz e frequência ultrassônica de 20 kHz. Acoplado ao ultrassom foi utilizado um probe de 3mm com capacidade de volume entre 250µL e 10 mL na potência de 30%. As cepas de *C. vulgaris* foram cedidas pelo banco de cultura da University of Toronto Culture Collection of Algal and Cyanobacteria, Toronto, ON, Canadá (UTCC 164).

As técnicas modificadas para ultrassom seguiram a metodologia de Schuchardt & Lopes (1988), Metcalf & Schmitz (1961), Bannon et al. (1982a), Bannon et al. (1982b).

Os ésteres oriundos das extrações e derivatizações diretas foram analisados semi-quantitativamente e qualitativamente em cromatógrafo a gás marca Shimadzu, modelo GC-2010, utilizando o método por comparação ao padrão FAME Mix 37 (Supelco) e área normatizada pelo programa GC Solution.

O GC/FID está equipado com injetor *split/splitless*, detector por ionização de chama (DIC) e coluna capilar RTX- Wax (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). Foram utilizados as seguintes condições: gás carreador H<sub>2</sub>, vazão de 1.2 mL/min, split 1:50. Programação do forno: temperatura inicial 100°C permanecendo nesta temperatura por 0,5 min com rampa de aquecimento em 7°C/min até 175°C, após com aquecimento de 5°C/min até 190°C mantendo-se nesta temperatura por 1min indo após a 1,20°C/min até 230°C ficando estável nesta temperatura por 11,45 min.

Os métodos descritos abaixo foram modificados para ultrassom a partir dos métodos originais.

### **Método de Schuchardt & Lopes, 1988**

Em um frasco pesou-se 1,25 g de biomassa seca da microalga *C. vulgaris* onde foram adicionados 2 mL do 1,1,3,3 tetrametilguanidina em metanol (1:4). O meio reacional foi sonicado em ultrassom por 2 min em amplitude de 30%. Após o período de sonicação, o extrato formado foi extraído com 40 mL de hexano e 100 mL solução saturada de NaCl. A fase aquosa foi separada e descartada, sendo a fase orgânica seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. O solvente foi evaporado em rota evaporador e resíduo pesado em balança analítica.

### **Método de Metcalf & Schmitz 1961**

Para a realização do método foi pesado aproximadamente 1,0 g de biomassa seca da microalga *C. vulgaris* e acrescentados 27,0 mL de solução de NaOH a 0,5 mol/ L. A biomassa em meio básico foi sonicada em ultrassom por 2 min a amplitude de 30%, sendo após adicionados 33,3 mL de BF<sub>3</sub> e sonicado por mais 2 min. Foi feita a extração dos ésteres com 15 mL de hexano e 35 mL de NaCl. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada em rota-evaporador, sendo o resíduo pesado posteriormente.

### **Método de Bannon, 1982a**

Em um frasco pesou-se aproximadamente 1,0 g de biomassa seca de *C. vulgaris* onde foram adicionados 26,7 mL da solução de KOH em metanol a 0,5 mol/ L. A solução com a biomassa foi sonicada por 2 min em amplitude de 30%, sendo adicionados no frasco reacional 33,3 mL de BF<sub>3</sub> e novamente sonicado por mais 2 min. Logo após foi feita a extração com 133,33 mL de isoctano e 35 mL solução saturada de NaCl. Utilizou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para secagem da fase orgânica, a qual foi evaporada em rota-evaporador rotativo e o resíduo formado, foi pesado em balança analítica.

### **Método de Bannon, 1982b**

Para realização do método de Bannon (1982b) modificado, utilizou-se 30 mL de solução NaOH a 0,25 mol/ L em metanol/ éter etílico (1:1) e 1g de biomassa seca de *C. vulgaris*. Foi feita a sonicação por 2 min em amplitude de 30%. Para extração, lavagem e secagem da fase orgânica foram utilizados separadamente 20 mL de isoctano, 100 mL solução saturada de NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A fase orgânica seca foi evaporada em rota-evaporador e pesada.

mL de isoctano, 100 mL solução saturada de NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A fase orgânica seca foi evaporada em rota-evaporador e pesada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tab. 1 mostra os resultados das extrações feitas por diferentes metodologias, as quais foram modificadas para ultrassom e analisadas em GC/FID.

**Tabela 1:** Porcentagem de ácidos graxos presentes em *C. vulgaris* por extraídos por ultrassom

Ácido graxo	* Método de Schuchardt & Lopes (1988)	* Método de Metcalf & Schmitz (1961)	* Método de Bannon (1982a)	* Método de Bannon (1982b)
C 12:0	0,08%	0,09%	0,22%	0,18%
C 14:0	0,45%	0,51%	0,74%	0,72%
C 16:0	37,30%	37,65%	38,07%	24,29%
C 16:1	5,17%	4,41%	3,91%	7,59%
C 18:0	2,63%	2,52%	2,43%	1,16%
C 18:1	7,40%	5,89%	6,58%	4,21%
C 18:2	8,88%	5,25%	3,54%	4,18%
C 18:3n3	0,61%	0,43%	0,32%	0,47%
C 22:0	0,75%	0,59%	0,64%	0,52%
C 24:0	2,11%	1,98%	2,36%	-
Total	65,4%	59,3%	58,8%	44,3%

\* Métodos modificados para ultrassom com base em métodos descritos na Literatura.

Os percentuais de ácidos graxos saturados extraídos ficaram em proporção semelhantes entre os métodos Schuchardt & Lopes (1988), Metcalf & Schmitz (1961) e Bannon (1982), com valores percentuais de 43,3%, 43,3% e 44,5%, respectivamente. O método de Bannon (1982b) obteve 26,9% como total de ácidos graxos saturados extraídos, mostrando-se não ser eficiente em relação aos outros métodos.

A comparação no processo extrativo entre os quatro métodos mostrou que o tipo de catalisador, as concentrações molares e o solvente extrator afetam significativamente os resultados.

Na Tab. 1 podemos observar uma diferença significativa de extração de ácidos graxos saturados em função da concentração (0,25 ou 0,5M) e insignificante para o tipo de catalisador (NaOH ou KOH), levando aos melhores resultados em concentrações mais altas.

O método de Schuchardt & Lopes (1988) modificado foi o que obteve melhores resultados no sentido extrativo e derivatizante entre todos os métodos trabalhados. Obteve-se um percentual de 12,6% de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) extraídos, isto é, 18,3% acima do método Metcalf & Schmitz (1961), 16,7% superior a Bannon (1982a) e 6,4% acima de Bannon (1982b).

Em comparação aos outros métodos o de Schuchardt & Lopes (1988) obteve melhores resultados para ácidos graxos poliinsaturados com um total de 9,41%.

A eficiência do método de Schuchardt & Lopes (1988) está relacionado principalmente ao catalisador orgânico de tetrametilguanidina. Este catalisador é uma das bases mais fortes, sendo muito eficiente nos processos de derivatização e transesterificação, além de ser fácil a sua recuperação.

### 4 CONCLUSÃO

Os resultados das derivatizações diretas de microalga *C. vulgaris* obtidos nos métodos modificados para ultrassom mostraram-se eficazes, rápidos e econômicos. Assim, a utilização da sonoquímica como meio extrativo e derivatizante na obtenção de ésteres de ácidos graxos mostrou ser viável, podendo ser utilizado como uma técnica alternativa na obtenção de biocombustíveis.

## 5 REFERÊNCIAS

TEIXEIRA, C. M., MORALES, M. E. **Microalga como matéria prima para produção de biodiesel.** Disponível em <http://www.dms.ufsc.br/mip5131/arquivos/Biodieseldealgas.pdf>

BILGEN, S., KELES, S., KAYGUSUZ, A., SARI, A., KAYGUSUZ, A. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: a case study in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, n.2, 372-396, 2008.

LIANG, Y. N., SARKANY, N. CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, 1043-1049, 2009.

HOBUSS, C. B. ; VENZKE, D. ; PACHECO, B. S. ; SOUZA, A. ; SANTOS, M. A. Z. ; MOURA, S. ; QUINA, F. H. ; FIAMETTI, K. G. ; OLIVEIRA, J. V. ; PEREIRA, C. M. P. Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, 387-389, 2012.

NEUENFELDT, P. D.; DUVAL, A. R.; DRAWANZ, B. B.; ROSALES, P. F.; GOMES, C. R. B.; PEREIRA, C. M. P. de; CUNICO, W., Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from Piperonilamine, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, 65-67, 2010.

SCHUCHARDT, U.; LOPES, O. C. Tetramethylguanidine catalysed transesterification of fats and oils: A new method for rapid determination of their composition, **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 65, n.12, 1940-1941, 1988.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis, **Analytical Chemistry**, v. 33, n. 3, 363-364, 1961.

BANNON, C. D.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O'ROURKE, K. L., Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride methanol, **Journal of Chromatography**, n. 247, 63-69, 1982a.

BANNON, C. D.; BREEN, G. J.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O'ROURKE, K. L., Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of apid procedures for the methoxide-catalysed methanol of fats and oils. **Journal of Chromatography**, n. 247, 71-89, 1982b.