

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E MISSÕES –  
URI ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**NAIANE SABEDOT MARCON**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE  
MICROALGAS UTILIZANDO PROPANO COMO FLUIDO PRESSURIZADO**

Erechim, Novembro de 2016.

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E MISSÕES –  
URI ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**NAIANE SABEDOT MARCON**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE  
MICROALGAS UTILIZANDO PROPANO COMO FLUIDO PRESSURIZADO**

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Clarice Steffens  
Clarissa Dalla Rosa

Erechim, Novembro de 2016.

**Produção enzimática de ésteres etílicos a partir de microalgas  
utilizando propano como fluido pressurizado**

Naiane Sabedot Marcon

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Clarice Steffens, D. Sc  
Orientadora

---

Prof. Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.  
Orientadora

---

Prof. Jamile Zeni, D. Sc  
URI – Campus de Erechim

---

Prof. Natália Paroul, D. Sc  
URI – Campus de Erechim

---

Prof. João Paulo Bender, D. Sc  
UFFS – Chapecó

---

Prof. Wagner Priamo, D. Sc  
IFRS – Erechim

Erechim, novembro de 2016.

NESTA PAGINA DEVER´SSER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA TESE DE DOUTORADO. ESTÁ FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI-CAMPUS ERECHIM

A todos que me apoiaram para concluir está  
etapa da minha vida, em especial a minha  
mãe que foi e sempre será um grande  
exemplo de mulher, batalhadora e guerreira.

*“Você tem que encontrar o que você gosta. E isso é verdade tanto para o seu trabalho quanto para seus companheiros. Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida, e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer. Se você ainda não encontrou, continue procurando. Não se contente. Assim como com as coisas do coração, você saberá quando encontrar. E, como qualquer ótimo relacionamento, fica melhor e melhor com o passar dos anos. Então continue procurando e você vai encontrar. Não se contente.”*

*Steve Jobs*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou o caminho durante esta caminhada.

A minha mãe pelo apoio e amor e graças aos seus ensinamentos que consegui seguir em frente após sua partida.

A minha família, em especial meu pai e meu irmão, que sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu amor pela confiança, carinho, dedicação e incentivo.

As minhas orientadoras Clarissa Dalla Rosa e Clarice Steffans, pelo conhecimento transmitido, incentivo durante o desenvolvimento do trabalho e a amizade.

Ao Instituto Federal de Sertão, em especial a Denise Bilibio, e ao professor Wagner Priamo, pela parceria e disponibilidade para a realização deste trabalho.

A Rosicler Colet, a minha irmã de coração que esteve comigo desde o começo, sempre me apoiando até mesmo nas noites acordadas na URI.

A Ju e a Sandy que providenciavam a minha alimentação, durante as longas horas da reação e pelas conversas e incentivo.

A todos os amigos dos laboratórios de Termodinâmica e Biotecnologia, em especial a Marcella, Letícia, Naira, Ana, Júnior, Adri, Jonaina, Márcia, Simone, Cindy, Sidiane e Alexandra pelos momentos de descontração e amizade.

A todos os funcionários e professores do Curso de Engenharia de Alimentos da URI– Campus de Erechim, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

A URI, FAPEGS, CAPES, CNPq pela estrutura e apoio financeiro na realização desta pesquisa.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

## **Produção enzimática de ésteres etílicos a partir de microalgas utilizando propano como fluido pressurizado**

**Naiane Sabedot Marcon**

**Novembro/ 2016**

Orientadores: Clarice Steffens e Clarisa Dalla Rosa.

A busca por combustíveis renováveis e sustentáveis está se tornando cada vez mais importante. A utilização de biomassa como matéria-prima energética é uma das formas mais promissoras para reduzir a dependência energética dos recursos fósseis não renováveis e, ao mesmo tempo reduzir o aquecimento global causado pela alta quantidade de carbono emitida pelos veículos abastecidos com combustíveis fósseis. O biodiesel é atualmente a alternativa mais aceita para substituição do combustível para motores diesel. Está classificado em Biodiesel de primeira, segunda e terceira geração de acordo com a matéria prima utilizada para a sua produção. E é o biodiesel de terceira geração produzido a partir de microalgas que tem emergido como uma das mais promissoras fontes alternativas aos combustíveis fósseis, porque apresentam uma grande eficiência fotossintética para a produção de biomassa, maiores taxas de crescimento e maior produtividade em relação às culturas convencionais. O método mais utilizado para a conversão de óleo ou biomassa em ésteres é a transesterificação. A fim de reduzir uma etapa durante o processamento, este trabalho realizou a transesterificação direta onde a extração e reação ocorrem ao mesmo tempo, reduzindo assim uma etapa do processo. Os métodos de transesterificação direta necessitam um maior teor de solvente para facilitar a extração aumentando assim o rendimento. Com o objetivo de diminuir a quantidade de solvente utilizado durante a transesterificação direta, este trabalho busca produzir ésteres etílicos a partir de biomassa de microalga *Chlorella vulgaris*, fazendo uso de um catalisador enzimático imobilizado (Novozym 435) associado ao uso de fluido pressurizado (propano). As reações foram realizadas em um reator PARR de 100 mL, a uma velocidade de 1300 rpm. Num estudo preliminar,

onde se utilizou uma pressão de 50 bar, temperatura de 65°C, razão molar óleo:etanol 1:6, e 20% de enzima, obteve-se uma conversão de 35,35 % de ésteres com relação ao peso de biomassa apresentando. Por tratar de um sistema novo sob investigação, o teste preliminar mostrou relevância, então uma avaliação do efeito das variáveis (tempo, temperatura e pressão) foram realizadas, apesar das condições de processo não estarem otimizadas, já apresentaram uma conversão de 51,14% (teor de óleo) em rendimento de éster etílico. Um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> visando otimizar a conversão em biodiesel no sistema reacional, foi estudado aplicando uma faixa menor de temperatura e uma maior faixa de pressão, se obteve a maior conversão em ésteres etílicos (74,39%), a uma temperatura de 50 °C e a uma pressão de 180 bar. Após otimizar o tempo e a temperatura, foi avaliada a concentração enzimática, tendo maior resultado (78,44% EEAG) quando adicionados 25% de enzima. Avaliou-se a razão molar óleo:etanol, e a partir da razão molar 1:24, o aumento da conversão foi menor que 1%. Depois de ter definido a melhor temperatura (50 °C), pressão (180 bar), concentração enzimática (20%), e razão molar óleo:etanol (1:24), foi realizada a cinética enzimática, e no tempo de 7 horas de reação quase atingiu 100% de conversão (98,98%). Por fim, o estudo de reuso da enzima *Novozym 435* permitiu verificar que a mesma manteve sua atividade durante dois ciclos, perdendo sua atividade a partir do terceiro ciclo.

**PALAVRA-CHAVE:** *Chlorella vulgaris*, transesterificação,, *Novozym 435*, otimização.

Abstract of Thesis submitted to Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering (D.Sc.)

## **Enzymatic production of ethyl ester from microalgae using propane as pressurized fluid**

Naiane Sabedot Marcon

Advisors: Clarice Steffens e Clarissa Dalla Rosa

The search for renewable and sustainable fuels is becoming more important. As a result, the use of biomass as an energy feedstock is one of the most promising ways to reduce energy dependence from non-renewable fossil fuels. The method more utilized for converting biomass or oil in ester is the transesterification and to reduce a stage during processing, direct transesterification is used, where extraction and reaction occur simultaneously. The methods of direct transesterification require a higher solvent content in order to facilitate the extraction so increasing the yield. Aim to decrease the quantity of solvent used during direct transesterification, this study sought to produce biodiesel from biomass of microalgae *Chlorella vulgaris* with use of an immobilized enzyme catalyst (Novozym 435) associated to the use of pressurized fluid (propane). The reactions were performed in a 100 ml PARR reactor, at a speed of 1300 rpm. In a preliminary study, where they used a 50 bar pressure, 65 ° C, molar ratio oil: ethanol 1: 6, and 20% enzyme gave a conversion of 35.35% the ethyl esters for biomass weight. It is a new system that is under scrutiny, which has shown consistency through the experimental design technique, in evaluating the effect of significant process variables (time, temperature and pressure). Even though the process conditions were not optimized, the results have already presented a conversion of approximately 51,4% (oil content) to yield ethyl ester. A central composite design  $2^2$  to optimize the conversion in biodiesel in the reaction system was studied, a lower temperature range and a larger range of pressure, there was obtained the greatest conversion to ethyl esters (74.39%), at a temperature of 50 ° C and a pressure of 180 bar. After optimization the pressure and the temperature, enzyme concentration was rater and better result (78.44% in ethyl

esters) observed when added 25% enzyme. Was evaluated the molar ratio of oil: ethanol, as from 1:24 molar ratio, the increase in conversion was less than 1%. After having defined the better temperature (50 ° C), pressure (180 bar), enzyme concentration (20%), and molar ratio of oil: ethanol (1:24), the enzyme kinetics it was realized, in the time 7 hours the reaction reached almost 100% conversion to ethyl esters (98.98%). Finally, the enzyme reuse study Novozym 435 has shown that it maintained its activity for two cycles, losing its activity from the third cycle. After the development of this work, it was able to verify that the strategies used aiming at higher production ethyl ester increased production of ethyl ester showed potential, achieving a yield of 98.98% in ethyl esters using the best conditions for each variable to obtain biodiesel from biomass *Chlorella vulgaris*.

**KEYWORD:** *Chlorella vulgaris*, transesterification, Novozym 435, optimization.

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Objetivo Geral: .....	2
1.2	Objetivos Específicos: .....	2
2	Revisão Bibliográfica .....	4
2.1	Biocombustíveis.....	4
2.2	Biodiesel .....	5
2.3	Rotas para a produção de biodiesel.....	7
2.3.1	Parâmetros que devem ser considerados nas reações de transesterificação.....	12
2.4	Fluidos pressurizados.....	13
2.4.1	Matéria prima para a produção de biodiesel.....	15
2.5	Microalgas .....	17
2.5.1	Microalga como matéria prima para produção de biodiesel.....	21
2.6	Transesterificação in situ .....	26
2.7	Biodiesel a partir de microalgas.....	29
2.8	Considerações sobre o estado da arte.....	30
3	Metodologia.....	31
3.1	Especificação dos materiais .....	31
3.2	Determinação da atividade enzimática .....	32
3.3	Produção de éster etílicos a partir da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	33
3.3.1	Experimento preliminar .....	35
3.3.2	Planejamento experimental.....	35
3.3.3	Estudo da concentração de enzima.....	37
3.3.4	Estudo da razão molar entre os substratos.....	37
3.3.5	Estudo cinético .....	37
3.3.6	Avaliação de sucessivos ciclos de reuso do biocatalisador <i>Novozym 435</i> .....	37

3.4	Determinação da conversão em ésteres .....	38
3.5	Aparato experimental para extração do óleo de microalga para análise cromatográfica da composição de ácidos graxos .....	39
3.5.1	Determinação dos perfis de ácidos graxos .....	40
3.5.2	Determinação de ácidos graxos – Esterificação .....	40
4	Resultados e discussão .....	42
4.1	Teste preliminar .....	42
4.2	Avaliação do efeito das variáveis: pressão, temperatura e tempo na conversão em ésteres etílicos .....	43
4.2.1	Delineamento composto central rotacional $2^2$ .....	49
4.2.2	Determinação do Perfil de Ácidos Graxos .....	52
4.3	Concentração de enzima .....	55
4.4	Avaliação da razão molar óleo:etanol.....	57
4.5	Cinética de Produção de Biodiesel Enzimático de Biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	59
4.6	Reutilização da enzima Novozym 435 na produção de biodiesel enzimático de biomassa de microalga.....	61
5	Conclusões e Sugestões .....	63
5.1	Conclusões .....	63
5.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	64
6	Referências Bibliográficas.....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Comparativo entre o consumo de energia no mundo e no Brasil (EPE – Empresa de Pesquisa Energética – Ministério de Minas e Energia). .....	5
<b>Figura 2</b> - Reação de esterificação, entre um ácido carboxílico e um álcool, formando um éster e água. ....	8
<b>Figura 3</b> - Reação de transesterificação, com 1 triglicerídeos e 3 álcoois formando ésteres e glicerol. ....	9
<b>Figura 4</b> - <i>Chlorella vulgaris</i> .....	21
<b>Figura 5</b> - Fluxograma do processo utilizado desde o crescimento da microalga até a produção do biodiesel.....	22
<b>Figura 6</b> - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para produzir éster etílicos a partir da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> : cilindro de fluido, (CV) “ <i>check valve</i> ”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1) banho termostático, (V1) válvula de alimentação para a bomba de alta pressão, (V2) válvula de alimentação do reator, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (CR) comando do controle de agitação, (V3) válvula de amostragem. ....	34
<b>Figura 7</b> - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para extração de óleo, cilindro de fluido, (CV) “ <i>check valve</i> ”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1, BR2) banhos termostáticos, (V1) válvula de alimentação do reator, (V2) válvula de amostragem, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão.....	40
<b>Figura 8</b> - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) para termos lineares e de interação das variáveis independentes para conversão em éster etílicos em termos de pressão, temperatura e tempo.....	45
<b>Figura 9</b> - Superfícies de resposta e curvas de contorno para conversão em ésteres das variáveis: (a) temperatura e pressão; (b) tempo e pressão; (c) temperatura e tempo. ....	47
<b>Figura 10</b> - a) Superfície de resposta; b) Curva de contorno para conversão de EEAG. ....	51
<b>Figura 11</b> - Transesterificação de biomassa de microalga com diferentes concentrações enzimáticas .....	55
<b>Figura 12</b> - Transesterificação de biomassa de microalga com diferentes razões molar álcool : etanol. ....	57
<b>Figura 13</b> - Cinética de produção de biodiesel enzimático de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	60

**Figura 14** - Atividade de esterificação da Novozym 435 após cada ciclo de uso para produção de biodiesel enzimático de biomassa de microalga. .... 62

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Produção de biodiesel catalisada por enzimas .....	11
<b>Tabela 2</b> - Comparação entre as diferentes culturas utilizadas para a produção de biodiesel.....	18
<b>Tabela 3</b> - Conteúdo lipídico e produtividade de biomassa das diferentes espécies de microalgas.....	24
<b>Tabela 4</b> - Métodos de extração de óleo de microalga. ....	27
<b>Tabela 5</b> - Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de extração de óleo de microalga. ....	28
<b>Tabela 6</b> - Caracterização dos nutrientes da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	31
<b>Tabela 7</b> - Variáveis e níveis experimentais avaliados para obtenção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas.....	36
<b>Tabela 8</b> - Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> , para otimização da produção enzimática de biodiesel a partir de biomassa de microalga. ....	36
<b>Tabela 9</b> - Matriz do DCCR 2 <sup>3</sup> a conversão em ésteres a partir da biomassa da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	44
<b>Tabela 10</b> - Análise de variância para conversão éster etílicos com relação as variáveis tempo, temperatura e pressão. ....	45
<b>Tabela 11</b> - Matriz do DCCR com a resposta em termos de conversão em ésteres etílicos.....	49
<b>Tabela 12</b> - Análise dos efeitos para termos lineares e quadráticos e de interação das variáveis independentes para a conversão em ésteres etílicos.....	50
<b>Tabela 13</b> - ANOVA para conversão em éster etílicos como respostas para o DCCR. 51	
<b>Tabela 14</b> - Determinação de Ácidos Graxos em <i>Chlorella vulgaris</i> obtidos a partir da extração do óleo.....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A energia é essencial para a vida e para o desenvolvimento da indústria. A demanda de energia vem aumentando a cada ano, isso gera grande preocupação devido ao seu grande consumo pelo setor industrial, sendo derivada de combustíveis fósseis e sua combustão um dos principais contribuintes para a poluição atmosférica, o que pode levar ao aquecimento global (AHMAD *et al.*, 2011, PRAVEENKUMAR *et al.*, 2012).

Esses fatores motivaram o desenvolvimento de fontes de energia renovável que poderiam substituir os combustíveis fósseis, dentre eles os biocombustíveis. Tendo como destaque a utilização do biodiesel que é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido principalmente pela transesterificação de gorduras e óleos vegetais na presença de um catalisador por um álcool primário (geralmente metanol, ou etanol), levando a formação de um éster metílico de ácido graxo (EMAG) ou éster etílico de ácido graxo (EEAG) (ALMEIDA *et al.*, 2012 e ABOMOHRRA *et al.*, 2016).

A transesterificação utilizando enzimas como catalisadores aparece como uma proposta para superar as desvantagens da produção de biodiesel catalisado de forma convencional (ácido ou alcalino), não sendo necessário o tratamento das águas residuais, e a recuperação do catalisador no final do processo é mais fácil, necessitando de uma quantidade inferior de solvente. Este processo tem mostrado resultados promissores, onde o glicerol pode ser facilmente recuperado, sem a necessidade de um processo complexo e os ácidos graxos livres contidos nos óleos podem ser completamente convertidos em ésteres metílicos ou etílicos (ANGARITA *et al.*, 2012).

Um problema relacionado ao uso de enzimas como catalisadores para a produção de biodiesel é uma reação mais lenta quando comparada a catalisadores alcalinos, e menores temperaturas devem ser utilizadas a fim de evitar a inativação enzimática (CHRISTOPHER *et al.*, 2014). Para incrementar a velocidade da reação os fluidos pressurizados têm sido amplamente explorados para sua utilização em meios de reação com solvente, pois possuem viscosidades e difusividades intermediárias entre gases e líquidos. Além disso, tensões superficiais aproximadamente nulas permitem a fácil penetração destes solventes em materiais macro e micro poroso. Todas estas características tornam os fluidos pressurizados atrativos como solventes quando as limitações de transferência de massa são elevadas como no caso da transesterificação

enzimática em solventes orgânicos. A alta difusividade obtida com fluidos pressurizados pode ser utilizada para melhorar as taxas das reações e, portanto, a transesterificação enzimática em meio supercrítico pode ser considerada como uma abordagem vantajosa (FALCÃO, 2011).

O desenvolvimento de novas tecnologias é importante para assegurar o suprimento energético das populações. Estudos mostraram que os óleos encontrados nas microalgas possuem similaridade quanto às características físico-químicas dos óleos vegetais em geral, dessa forma podem ser consideradas matérias primas potenciais para a produção de biodiesel (FAO, 2006).

As microalgas têm inúmeras vantagens sobre outras matérias primas, por consumir menos água e nutrientes para crescer em comparação com as culturas terrestres. Podem ter uma produtividade em termos de óleo vinte vezes maior do que as oleaginosas. Crescem rapidamente e o seu tempo de duplicação varia de 3,5 h a 24 h. A alta taxa de crescimento em um curto espaço de tempo resulta numa elevada produção de biomassa. Outro fator bastante importante é que as microalgas podem crescer nos efluentes industriais ou domésticos, utilizando nitrogênio e fósforo como fontes de nutrientes. As microalgas também podem adsorver gases de combustão industrial e CO<sub>2</sub> atmosférico, convertendo CO<sub>2</sub> em moléculas orgânicas (hidratos de carbono, proteínas e lipídeos) através da fotossíntese (RASHID, 2014).

Diante deste cenário e das investigações prévias realizadas é que se fundamenta a proposta deste trabalho, cujo objetivo geral e os objetivos específicos são apresentados a seguir.

### **1.1 Objetivo Geral:**

Produzir ésteres etílicos a partir de biomassa de microalgas *Chlorella vulgaris* utilizando propano como fluido pressurizado e catalisador enzimático (Novozym 435).

### **1.2 Objetivos Específicos:**

Em consonância com o cenário do apresentado, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. Estudar o efeito das variáveis temperatura, pressão, razão molar, óleo-etanol, concentração da enzima sobre a conversão da reação de produção de ésteres

etílicos de microalga em propano pressurizado para otimizar a produção de ésteres neste sistema;

2. Realizar uma cinética da condição otimizada para determinar o melhor tempo de reação;
3. Estudar a reutilização (número de ciclo) da enzima comercial, Novozym 435, em meio propano pressurizado na transesterificação *in situ* da biomassa de *Chlorella vulgaris* em modo batelada.

Como forma de embasamento do presente trabalho, primeiramente será apresentado o estado da arte sobre o assunto, procurando evidenciar os resultados e lacunas presentes na literatura referentes ao tema do presente estudo. O Capítulo 3 apresenta os métodos analíticos utilizados no decorrer deste trabalho bem como a montagem do aparato experimental e o procedimento utilizado para a realização dos experimentos. No Capítulo 4 serão apresentados e discutidos os resultados obtidos e no Capítulo 5 serão apresentadas algumas conclusões decorrentes da realização deste trabalho e sugestões para etapas futuras. As referências bibliográficas utilizadas no decorrer do presente estudo são citadas no Capítulo 6.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item é apresentada, de forma sucinta a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre microalgas, formas de extração do óleo e produção de biodiesel em fluidos pressurizado.

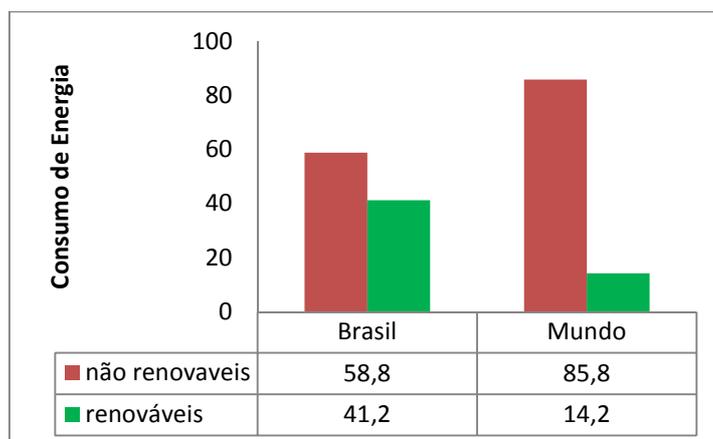
### 2.1 *Biocombustíveis*

Muitos países estão voltando sua atenção para o desenvolvimento de novas fontes de energia sustentáveis e renováveis, tais como os biocombustíveis. Essas novas fontes apresentam grande interesse, pois poderão desempenhar um papel crucial na infraestrutura energética global em um futuro próximo (CHEN *et al.*, 2011).

A Agência Nacional de Petróleo (ANP) descreve Biocombustíveis como derivados de biomassa renováveis que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados do petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol extraído de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis.

No Brasil, segundo a ANP (2015), 41,2% da energia e 18% dos combustíveis consumidos já são renováveis, enquanto que o consumo de energias renováveis no mundo apresenta um percentual de 14%. Pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo. A Figura 1 apresenta um comparativo da energia renovável e não renovável consumida no mundo e no Brasil, baseado nos dados obtidos da resenha energética brasileira, exercício 2015.

**Figura 1-** Comparativo entre o consumo de energia no mundo e no Brasil (EPE – Empresa de Pesquisa Energética – Ministério de Minas e Energia).



Fonte: (EPE – Empresa de Pesquisa Energética – Ministério de Minas e Energia 2015).

## 2.2 Biodiesel

É de conhecimento público que óleos vegetais e gorduras animais já foram investigados como combustível para motores do ciclo diesel muito tempo antes da crise energética dos anos 70 e nos primeiros anos de 80, aumentando o interesse nestes combustíveis alternativos. Rudolph Diesel o inventor da máquina que veio a receber o seu nome, também teve algum interesse neste tipo de combustível. Segundo a biografia de Diesel, escrita por Eugen Diesel (1937 apud KNOTHE 2006), durante a Exposição de Paris de 1900, a companhia francesa Otto demonstrou o funcionamento de um pequeno motor diesel com óleo de amendoim.

Acredita-se que a patente belga sob o nº 422.877, concedida em 31 de agosto de 1937 ao pesquisador G. Chavanne (CHAVANNE, 1938 apud KNOTHE, 2006) representa o primeiro relato do que hoje é conhecido como biodiesel, onde é descrito o uso de ésteres etílicos de óleo de palma (embora outros óleos vegetais e ésteres metílicos também foram mencionados) obtido por transesterificação em meio ácido como combustível análogo ao diesel derivado do petróleo (CHAVANNE, 1944 apud KNOTHE, 2006).

Óleos vegetais foram usados como combustíveis de emergência, para substituir o diesel importado durante Segunda Guerra Mundial. Porém a necessidade de utilizar combustíveis alternativos veio após a crise do petróleo em 1973 e a guerra do golfo em 1991. Hoje, o biodiesel é produzido em vários países (KNOTHE, 2001; BALAT, 2009;

DEMIRBAS, 2010; AVINASH *et al.*, 2014). O biodiesel é qualquer biocombustível equivalente ao diesel obtido a partir de materiais biológicos renováveis, tais como óleos vegetais ou gorduras animais, e consiste em hidrocarbonetos saturados de cadeia longa. Pode ser misturado ao diesel em qualquer concentração ou usado na forma pura (B100). Quando comparado ao diesel de petróleo, o biodiesel apresenta significativas vantagens ambientais. Um estudo realizado pelo “National Biodiesel Board” (agência que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstrou que a queima de biodiesel pode emitir, em média, 48% menos monóxido de carbono; 47% menos material particulado (que penetra nos pulmões); 67% menos hidrocarbonetos. Esses percentuais variam de acordo com a quantidade de B100 adicionado ao diesel de petróleo, no B3 essas reduções ocorrem de modo proporcional, ou seja, B100 equivale a 100% de biodiesel e B3 a 3% de biodiesel adicionado ao diesel (ANP, 2015).

Desde 1º de novembro de 2014, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 7% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Medida Provisória nº 647, que alterou o percentual mandatório de biodiesel para 6%, a partir de 1º de julho de 2014, e para 7%, a partir de 1º de novembro deste mesmo ano. Esta alteração foi publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 28 de maio de 2014. Isso acrescentará cerca de 1,2 bilhão de litros de biodiesel ao consumo em 2015. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis.

Atualmente o biodiesel é a alternativa mais aceita para substituição do combustível para motores diesel, oferecendo vantagens ambientais e de segurança se comparado a o diesel. Apresenta um ponto de fulgor muito mais alto, o que diminui a possibilidade de produzir vapores de ar/combustível, possui melhor qualidade de ignição, pois apresenta elevado teor de cetanos, que é um indicador importante na qualidade do combustível para motores de compressão interna (KNOTHE *et al.*, 2005; ZAPPI *et al.*, 2003). Seu armazenamento e manipulação são, portanto, mais seguros que o do diesel. Em condições normais de armazenamento o biodiesel pode ser estocado por um ano, sem mudanças dramáticas em seus parâmetros de qualidade, a aditivação correta garante que as amostras continuem a atender as especificações por períodos de estocagem superiores há um ano. Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário um transporte e armazenamento adequados, o contato com luz solar, água e ar deve ser

evitado (PRANKL, 2006). O biodiesel também é superior ao diesel no que diz respeito à sua natureza não tóxica e ao fato de ser biodegradável. O biodiesel pode ser degradado aproximadamente em 95% em um período de 30 dias, quando expostos a condições não favoráveis ao seu armazenamento, causando poucos problemas em caso de derramamento acidental e para a saúde do trabalhador. Por produzir menor quantidade de gases do efeito estufa por unidade de energia utilizável e, pela emissão de CO<sub>2</sub> ser inferior ao limite fixado pelas plantas que originaram o combustível, pode contribuir significativamente para a redução do efeito estufa. O biodiesel apresenta também conteúdo praticamente nulo de enxofre (FUKUDA *et al.*, 2001; BONDIOLI, 2004, SANTIN, 2013).

### **2.3 Rotas para a produção de biodiesel**

Os dois processos mais utilizados, na produção de biodiesel são a transesterificação e a esterificação, embora existam outros processos que também possam ser utilizados, como microemulsões e pirólise. O objetivo desse processo é diminuir a viscosidade do óleo assim como melhorar o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel (CAMARGOS, 2005). Estes processos podem ser descrito como:

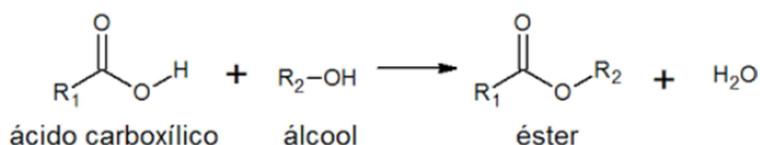
- **Microemulsificação:** é definido como uma dispersão de equilíbrio coloidal de fluidos isotrópicos, claros translúcidos, termodinamicamente estáveis, formada espontaneamente por dois líquidos imiscíveis (óleo vegetal e álcool) e um fluido anfifílico iônico ou não (MA e HANNA, 1999; FUKUDA *et al.*, 2001). As microemulsões foram propostas para solucionar os problemas associados à alta viscosidade apresentada pelos óleos vegetais. Assim para diminuição da viscosidade dos óleos é adicionado solvente aos óleos vegetais. Contudo, apesar das microemulsões apresentarem boas características no que diz respeito aos padrões de atomização, verificou-se que um longo prazo provoca a deposição de carbono no motor, a combustão incompleta e o aumento da viscosidade de óleos lubrificantes (FELIZARDO, 2003; GARCIA, 2006).

- **Pirólise ou craqueamento térmico:** é um processo de refino de óleos e gorduras que consiste na quebra (*crack*) que ocorre em altas temperaturas (acima de 350

- 700°C), na ausência de oxigênio, provocando a quebra das moléculas dos triglicerídeos, na presença ou ausência de catalisador, formando uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados (MA e HANNA, 1999; DEMIRBAS, 2003; SUAREZ *et al.*, 2007, MARCILLA *et al.*, 2013). No entanto, este processo é bastante complicado, pois produz produtos secundários que não têm valor comercial.

- Esterificação: consiste em apenas uma reação entre um ácido carboxílico (R<sub>1</sub>COOH) com um álcool (R<sub>2</sub>OH) para obtenção de éster (R<sub>1</sub>COOR<sub>2</sub>) e água, como representado na Figura 2, podendo ser hidrolisado pela água produzida. Conseqüentemente, esterificação e hidrólise alcançam o equilíbrio. A esterificação é uma reação de pré-tratamento dos óleos e gorduras para reduzir a saponificação (CHEMSEDDINE e AUDINOS, 1995 e ANGARITA *et al.*, 2012).

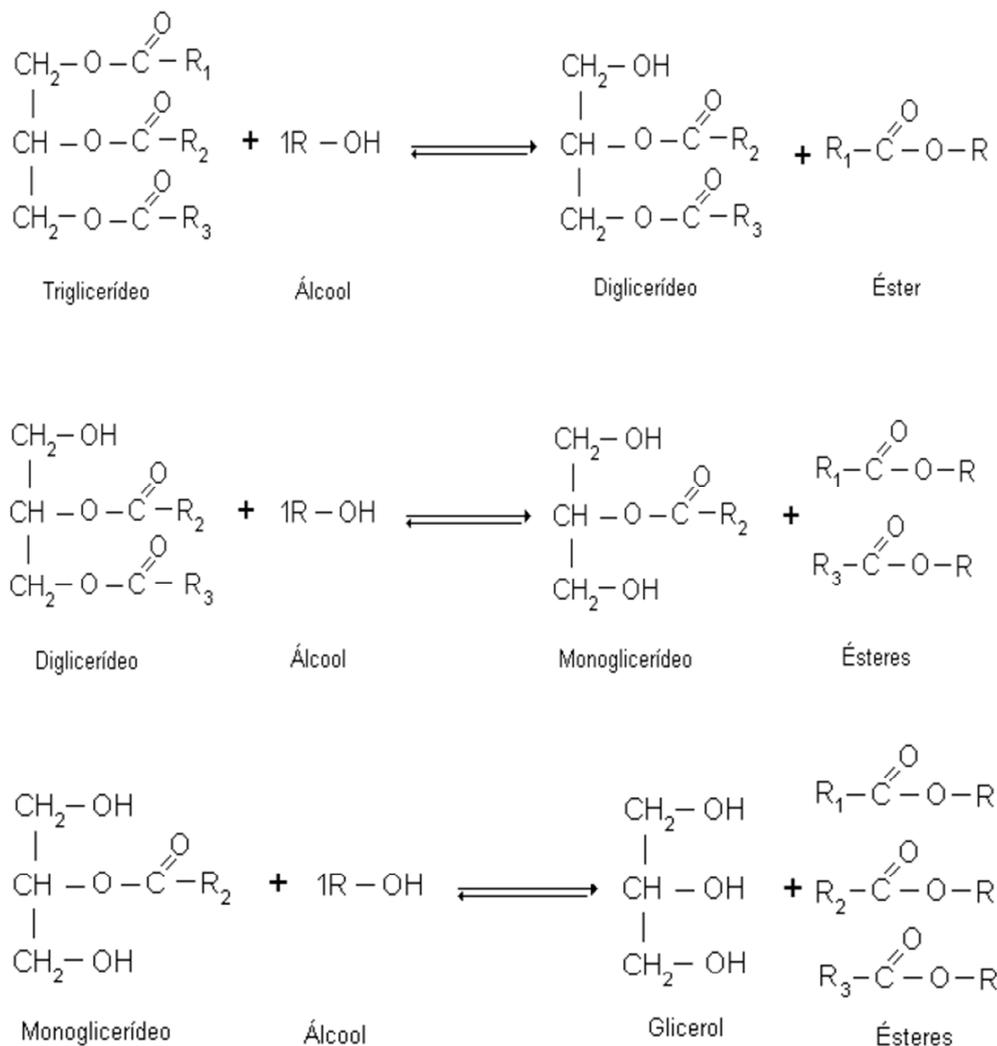
**Figura 2** - Reação de esterificação, entre um ácido carboxílico e um álcool, formando um éster e água.



Fonte: Autor

- Transesterificação: também pode ser chamada de alcoólise, envolve a reação catalítica de triglicerídeos (óleos vegetais e gorduras) com um álcool de cadeia linear simples, tais como metanol, etanol, propanol e butanol. A estequiometria dessa reação requer a razão molar álcool:triacilglicerol de 3:1. É uma reação de múltiplos passos, onde os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, em seguida, convertidos para monoglicerídeos que são convertidos em ésteres e glicerol. Como se tratar de um processo reversível, uma quantidade maior de álcool é utilizada, para favorecer o deslocamento do equilíbrio para direita (MEHER *et al.*, 2006 LOTERO *et al.*, 2006; MATA *et al.*, 2010). O processo de transesterificação está demonstrado na Figura 3.

**Figura 3** - Reação de transesterificação, com 1 triglicerídeos e 3 álcoois formando ésteres e glicerol.



Fonte: Trentin (2010).

A transesterificação de triglicerídeos pode ser conduzida por rotas catalíticas onde diferentes tipos de catalisadores (básicos, ácidos ou enzimáticos) podem ser empregados e não catalíticas onde são utilizados fluidos supercríticos (MADRAS *et al.*, 2004). A seguir está descrito um pouco sobre cada tipo de catálise:

Catálise ácida: é catalisado por ácidos de Brönsted preferivelmente por ácidos sulfônicos. Estes catalisadores produzem elevados rendimentos em álquil-ésteres, mas as reações são lentas. Segundo Canakci e Sanli (2008) o processo de catalise ácida pode ser considerado como um pré-tratamento, sendo uma reação através da qual os ácidos graxos livres são convertidos em monoésteres. O principal obstáculo para o pré-

tratamento é a formação de água que faz com que o processo de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres seja inibido.

Catátise Alcalina: No processo de transesterificação alcalina a reação é catalisada por metais alcalinos, alcóxidos e hidróxidos, bem como por carbonatos de sódio e potássio. Os catalisadores alcalinos apresentam um elevado rendimento na obtenção de óleos vegetais com alta qualidade do combustível, porém para um bom rendimento é necessário que o teor de água e de ácidos graxos livres seja inferior a 0,06% (m/m) e 0,5% (m/m) respectivamente. Como a matéria prima alcalina mais utilizada para a produção de biodiesel é o hidróxido de sódio, por ser mais barato, tendo como característica apresentar quantidades superiores de ácidos graxos livres pode levar a formação de sabão, diminuindo o rendimento de ésteres, além da saponificação formar emulsões que dificultam a recuperação do catalisador. E as reações secundárias de saponificação e hidrólise afetam a pureza e o rendimento do biodiesel. A remoção destes catalisadores e do glicerol é tecnicamente difícil e acarreta um custo extra no produto final. E a recuperação e o tratamento das águas residuárias é necessário (CHRISTOPHER *et al.*, 2014, BALAT e BALAT, 2010). E a neutralização das águas residuárias.

Catalise Heterogênea: Catalisadores heterogêneos são aqueles que estão em um estágio diferente do reagente, ou seja, não se dissolve em álcool ou óleo, são sólidos e, portanto são facilmente recuperados no final da reação. Esses catalisadores podem superar alguns dos principais problemas do uso de catalisadores homogêneos como a necessidade de purificação e tratamento de efluentes contaminados com os catalisadores. Além disso, o glicerol produzido é incolor e possui uma pureza elevada de 95% (BOURNAY *et al.*, 2005).

Métodos não catalíticos: É possível conduzir a transesterificação na ausência de um catalisador, uma estratégia que requer altas pressões (20 MPa) e altas temperaturas (350°C) (DASARI *et al.*, 2003). A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam melhora significativa no seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (McHGGH e KRUKONIS, 1994).

Catálise Enzimática: É a mais atraente, pois pode evitar formação de sabão e o processo de purificação é simples de realizar. Alcoólise de triglicerídeos com uma lipase é

considerada uma das reações mais eficazes para a produção de biodiesel. No entanto, eles são menos utilizados comercialmente devido ao maior tempo de reação e maior custo (LEUNG *et al.*, 2010 e BALAT E BALAT, 2010). A Tabela 1 apresenta a produção de biodiesel catalisada por algumas enzimas.

**Tabela 1** - Produção de biodiesel catalisada por enzimas

Substrato	Enzima	Condição operacional	Aceitador de acilo	Produção(%)
Óleo vegetal	<i>Lipozyme TL IM</i>	25°C, 7h	Etanol	84
Óleo vegetal	<i>Novozym 435</i>	25°C, 7h	Metanol	>99
Microalga	<i>Candida SP. lipase IM</i>	38°C, 12h	Metanol	98
Óleo de colza	<i>C.rugosa</i>	37°C,24h	2-etil-1-hexanol	97
Óleo de soja	<i>Novozym 435</i>	40°C, 14h	Acetato de Metila	92
Óleo de soja	<i>P.fluorescens</i>	35°C, 90 h	Metanol	80
Óleo de soja	<i>C. rugosa</i>	35°C, 90 h	Metanol	80
Óleo de girassol	<i>R. miehei</i>	40°C, 48h	Metanol	95,5
Óleo de girassol	<i>IM C.antarctica</i>	50°C, 12h	acetato de etila	63,3

Fonte: adaptada de Christopher *et al.*(2014).

A síntese de biodiesel utilizando enzimas, tais como de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida sp.*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei* (*Lipozyme RMIM*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas lanuginosus* e *Thermomyces* é bem relatado na literatura (LUO *et al.*, 2006; JEONG e PARCK, 2007; SHAH e GUPTA, 2007; SHAO *et al.*, 2008; SANTIN, 2013). As lipases provenientes de fungos são mais utilizadas para a transesterificação. Os parâmetros ótimos para o uso de uma enzima específica dependem da origem e da formulação da lipase.

Estudos estão sendo realizados para a otimização das condições de reação (temperatura, solvente, pH, razão molar álcool/óleo, o tipo de micro-organismo que produz a enzima, etc), a fim de estabelecer as características adequadas para um processo de produção industrial. Os primeiros trabalhos sobre aplicação de enzimas para síntese de biodiesel foram realizados com éter de petróleo empregando o óleo de girassol como matéria prima e lipases de várias origens. Das lipases investigadas, apenas três foram capazes de catalisar a alcoólise, sendo que o melhor rendimento foi obtido com a enzima imobilizada a partir da bactéria *Pseudomonas sp.* Quando o processo foi repetido sem o solvente, empregando metanol como álcool para a reação, um rendimento em ésteres de apenas 3% foi observado, enquanto com etanol absoluto,

etanol 96% e 1-butanol, as conversões variaram de 70 a 82% (MITTELBAACH e TRATHINIGG, 1990).

### **2.3.1 Parâmetros que devem ser considerados nas reações de transesterificação**

Temperatura: A literatura mostra que a taxa de reação é fortemente influenciada pela temperatura da reação. A transesterificação pode ocorrer em diferentes temperaturas, dependendo do tipo de óleo. Contudo, normalmente ocorre a uma temperatura próxima ao ponto de ebulição do álcool (DARNOKO e CHERYAN, 2000; BARNWAL e SHARMA, 2005). Temperaturas mais elevadas podem diminuir a viscosidade do óleo e resultar em um aumento da taxa de reação e um tempo de reação mais curto. Em relação a sistemas enzimáticos, a temperatura ótima de operação é função da enzima a ser utilizada como catalisador da reação (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Tempo: A conversão aumenta com o tempo de reação. Os catalizadores homogêneos básicos precisam de tempos de reação menores que os catalizadores ácidos e os heterogêneos. As condições de temperatura e pressão devem se moderadas para os catalisadores ácidos e básicos (MA e HANNA, 1999). Para sistemas utilizando catalisadores químicos, a completa conversão do sistema é geralmente atingida em torno de 20 minutos de reação. No método enzimático com solventes orgânicos, a reação atinge conversão máxima em 5 horas de reação (FACCIO, 2004).

Razão Molar: Um dos fatores mais importantes que afetam o rendimento da produção de éster é a razão molar de álcool e triglicerídeo. A razão molar está associada ao tipo de catalisador usado. Reações catalisadas por ácido requerem o uso de elevadas relações molares álcool/óleo vegetal, a fim de obter bons rendimentos de produto em pequenos tempos de reação. Entretanto, os rendimentos de ésteres não aumentam proporcionalmente com a razão molar. Por exemplo, para a metanólise de óleo de soja usando ácido sulfúrico, aumenta de 77% usando uma razão molar de 3,3:1, para 87,8% para uma razão de 6:1. Altas relações molares de 30:1 mostram uma melhoria moderada, até se alcançar um valor máximo de conversão de 98,4% (LOTERO *et al.*, 2006).

Conteúdo de ácidos graxos livres: A quantidade de ácidos graxos livres nos óleos é um fator importante na reação quando catalisada por NaOH, pois será maior o rendimento para a neutralização. O conteúdo de água dos reagentes deve ser muito baixo, pois pode

alterar a rota da reação (hidrólise), o que aumentaria a viscosidade final do produto, dificultando o processo de separação (DALLA ROSA, 2006).

Catalisadores: A concentração de catalisador pode interferir o rendimento da produção de biodiesel, segundo Leung *et al.* (2010). O catalisador alcalino é comumente mais utilizado porque possibilita um menor tempo de reação se comparado com catalisadores ácidos.

Velocidade de agitação: é um fator crítico pouco mencionado na literatura, já que os reagentes constituem um sistema bifásico. Os álcoois não se dissolvem com triglicerídeo a temperatura ambiente e a mistura deve ser agitada mecanicamente para permitir a transferência de massa. Sendo assim cada vez mais se encontram estudos relacionados à velocidade de agitação (ANGARITA *et al.*, 2012).

#### **2.4 Fluidos pressurizados**

A combinação das propriedades das fases líquida e vapor, característica do estado supercrítico, ocorrem de uma forma extremamente vantajosa para a utilização dos FSC (fluido supercrítico) como solventes. Os FSC possuem densidades próximas a dos líquidos, o que fortalece as suas propriedades de solvente. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo. Todas estas propriedades singulares fazem dos FSC meios bastante interessantes para reações químicas (OLIVEIRA, 1999).

O uso de fluidos pressurizados como solventes para reações químicas pode ser uma rota promissora no sentido de eliminar traços de solvente dos produtos reacionais. Segundo Knez *et al.* (1998), He *et al.* (2007) e Knez *et al.* (2014) este método apresenta vantagens em relação às demais metodologias apresentadas para produção de biodiesel, dentre as quais podem ser destacadas:

- Os processos de purificação são muito mais simples, devido à possibilidade de evitar o uso de solventes orgânicos; obtendo produtos com elevado grau de pureza.
- Consumo de energia mais baixo devido às baixas temperaturas utilizadas durante o processo.
- Tempo de reação menor do que a reação catalítica tradicional de transesterificação, visto que as taxas de transferência de massa são mais eficientes.

- Matérias primas de baixa qualidade podem ser usadas neste método, uma vez que elevados teores de ácidos graxos livres e água não apresentam efeito negativo na reação. O teor de água e de ácidos graxos livres deve ser inferior a 0,06% (m/m) e 0,5% (m/m) respectivamente, na transesterificação catalisada por bases.

Comparando a outros gases, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) tem sido largamente estudado para ser utilizado como meio solvente em reações enzimáticas, porém o seu uso em reações enzimáticas que utilizam óleos vegetais como substrato, apresentam algumas limitações quanto à solubilidade de tais compostos e no que diz respeito à atividade/estabilidade de algumas lipases, pois suas características hidrofílicas podem afetar negativamente a enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2006; NDIAYE *et al.*, 2006). Referente a este aspecto, as propriedades do propano apontam vantagens sobre o CO<sub>2</sub>, as pressões envolvidas na extração de óleo utilizando propano são mais baixas do que aquelas com CO<sub>2</sub>, a solubilidade de óleos vegetais em CO<sub>2</sub> supercrítico é mais baixa se comparada com a solubilidade em propano, pois o propano líquido ou pressurizado é completamente miscível no óleo em temperatura ambiente. (ILLÉS *et al.*, 2000; ILLÉS *et al.* 1997; BRAVI *et al.*, 2002; HEGEL *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2008; PEDERSSETTI *et al.*, 2011). O que implica em um sistema mais apropriado para a realização das reações enzimáticas a partir de óleos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006 e LANZA *et al.*, 2005).

Oliveira *et al.* (2006) investigaram a influência da temperatura (35 - 75°C), pressão (10 - 250 bar), tempo de exposição (1 - 6 h) e a taxa despressurização (2 - 50 bar/min para propano e n-butano e 10 - 200 Kg/m<sup>3</sup>.min para CO<sub>2</sub>) na atividade de esterificação das enzimas Novozym 435 e Lipozyme IM. Os resultados mostraram que ambas as enzimas apresentaram uma perda significativa de atividade na presença de dióxido de carbono. Para os demais gases, a Lipozyme IM teve apenas uma pequena perda da atividade, enquanto que a Novozym 435 teve um ganho de atividade quando submetida ao propano e n-butano.

Altas conversões em ésteres são relatadas para ambos os sistemas, no entanto, requer a utilização de altos percentuais de enzima no meio de reação em relação à massa dos substratos. Dalla Rosa *et al.* (2008) apresenta a obtenção de biodiesel de soja em propano com a enzima comercial *Novozym 435*. Conversões completas da reação são relatadas em tempo de reação de 6 h, utilizando 3 e 5% (m/m) de enzima, porém quando

visto pelo aspecto de um menor tempo de reação, a concentração de 20 % de catalisador torna-se apreciável. No emprego de propano pressurizado, a razão solvente:substrato necessária para que boas conversões de ésteres sejam atingidas é de 2:1 conduzindo à conversões de até 82% em ésteres.

Segundo Bursamarello *et al.* (2010), a catalise enzimática em propano pressurizado pode ser uma alternativa potencial frente as técnicas convencionais para a produção de biodiesel, uma vez que foram obtidas boas conversões de éster etílicos de soja (92% m/m) em condições de temperatura (65°C) e pressão (50 bar) moderadas.

#### **2.4.1 Matéria prima para a produção de biodiesel**

A princípio toda a substância que possui triglicerídeos ou ácidos graxos em sua composição, pode ser usada para a produção de biodiesel. A composição de ácidos graxos na matéria prima para a produção de biodiesel é de fundamental importância. As características físicas dos ácidos graxos são determinadas pelo comprimento das cadeias e número de ligações duplas que elas contêm.

A literatura não descreve uma classificação oficial para biodiesel, alguns autores o classificam a partir da matéria prima utilizada para a sua produção:

##### Biodiesel de primeira geração

As matérias primas que se enquadram na primeira geração de biodiesel são as que podem ser utilizadas também na alimentação, como óleos comestíveis, entre elas estão a canola, soja, palma e girassol. Atualmente mais de 95% do biodiesel é produzido a partir de óleos comestíveis, o uso destas fontes tem gerado problemas, devido ao seu impacto sobre os mercados globais de alimentos, podendo assim afetar a segurança alimentar (BRENNAN e WENDE, 2010). Por exemplo, palma e soja são culturas cujos óleos são uma parte vital da alimentação humana. Desviar as culturas alimentares para a produção em grande escala de biodiesel poderia trazer desequilíbrio para o mercado mundial de alimentos (GUI *et al.*, 2008). Além disso, a oferta de óleo é limitada, não sendo possível alcançar as duas demandas, produção de óleo para fins comestíveis e para a produção de biodiesel. Assim, a sua utilização como um biocombustível pode causar competição com o mercado de óleo comestível, aumentando o custo dos óleos comestíveis e do biodiesel (KANSEDO *et al.*, 2009). Podendo ocorrer desequilíbrio

ecológico, pois diversas áreas estão sendo desflorestadas para fins de plantio, para tentar suprir as demandas.

### Biodiesel de segunda geração

Para reduzir a dependência do óleo comestível, outras fontes de matérias-primas não alimentares vêm sendo estudadas, tais como: pinhão-manso, jojoba, a sementes do tabaco, resíduos de óleos de cozinha, gordura de restaurante e gorduras animais, para a utilização na produção de biodiesel de segunda geração. Eliminando a concorrência com os recursos alimentares, além disso, os subprodutos podem ser reaproveitados em processos químicos ou queimados para geração de calor e energia (ANTUNES e SILVA, 2010).

A conversão do óleo não comestível em biodiesel é comparável com a de óleos comestíveis, em termos de produção e qualidade (PINZI *et al.*, 2009). Contudo, como no caso dos biocombustíveis de primeira geração a oferta de matéria-prima oferecida não é suficiente para alcançar a demanda de biodiesel existente (ANTUNES e SILVA, 2010).

### Biodiesel de terceira geração

Matérias primas de terceira geração para a produção de biodiesel, que são derivadas a partir de microalgas, têm emergido como uma das mais promissoras fontes alternativas para a produção de biodiesel, porque apresentam uma grande eficiência fotossintética para a produção de biomassa, maiores taxas de crescimento e produtividade em relação às culturas convencionais (RICHMOND, 2003).

Desse modo, a produção de biodiesel de terceira geração apresenta algumas vantagens como:

- Não afetam diretamente a cadeia de abastecimento alimentar humana.
- As microalgas ocupam uma área de terra bem menor que os outros cultivos.
- Reprodução rápida com alto rendimento de óleo.
- As microalgas podem ser cultivadas em vários ambientes que são inadequados para o cultivo de outras culturas, tais como água salgada ou terras não cultiváveis (PATIL *et al.*, 2008) que são inadequados para agricultura convencional. Além disso, podem ser cultivadas em fazendas ou em biorreatores (JANAUM e ELLIS, 2010).

- Microalgas produzem valiosos co-produtos ou subprodutos, tais como biopolímeros, proteínas, hidratos de carbono e biomassa residual, que podem ser utilizado como alimento ou fertilizantes. Além disso, o cultivo de microalgas não exige herbicidas nem pesticidas (RODOLFI *et al.*, 2009).
- Microalgas são fixadoras de CO<sub>2</sub> na atmosfera, contribuindo para a redução nos níveis de poluição. Além disso, a produção de biomassa de microalgas afeta a biofixação de CO<sub>2</sub> dos resíduos (CHISTI, 2007; RODOLFI *et al.*, 2009).
- Os lipídeos extraídos das microalgas são na sua maioria neutros, devido ao seu elevado grau de saturação e a sua acumulação nas células da microalga em diferentes fases de crescimento (dependendo da estirpe), tornando os lipídeos das microalgas um substituto potencial para o combustível diesel (McGINNIS *et al.*, 1997; DANQUAH *et al.*, 2009).

A Tabela 2 apresenta dados de diferentes culturas utilizadas para produzir biodiesel. Verifica-se que, embora os teores de óleo sejam semelhantes entre plantas, sementes e de microalgas, existem variações significativas na produtividade de biomassa total e rendimento de óleo resultante na produtividade de biodiesel, com uma clara vantagem para microalgas. Em termos de uso da terra, as microalgas seguidas do óleo de palma são claramente vantajosos devido à sua maior produtividade de biomassa e rendimento de óleo.

## 2.5 *Microalgas*

Microalgas são algas microscópicas comumente encontradas em sistemas de água doce e marinhas. São organismos fotossintéticos que estão atraindo um número crescente de interesse para aplicações industrial, tais como a produção de produtos químicos especiais e suplementos nutricionais (CHEN *et al.*, 2009). O termo microalga engloba uma série de micro-organismos de natureza distinta, incluindo tanto organismos eucarióticos (algas verde, vermelhas, diatomáceas e dinoflagelados) quanto procarióticos (algas verdes-azuladas ou cianobactérias) (MADIGAN *et al.*, 2004; TOMASELLI, 2004).

**Tabela 2** - Comparação entre as diferentes culturas utilizadas para a produção de biodiesel.

	Fonte Vegetal	Teor de óleo (% óleo em peso por biomassa)	Rendimento óleo (L óleo/ha ano)	Uso de terra (m <sup>2</sup> ano/kg biodiesel)	Produção de biodiesel (kg biodiesel /ha ano)
1ª GERAÇÃO	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
	Palma ( <i>Elaeis guineensis</i> )	36	5366	2	4747
	Soja ( <i>Glycine mas</i> L.)	18	636	18	562
	Camelina ( <i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
	Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
	Girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
2ª GERAÇÃO	Mamona ( <i>Ricinus communis</i> )	48	1307	9	1156
	Pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
	Maconha ( <i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
3ª GERAÇÃO	Microalga (baixo teor de óleo)	15	58.700	0,2	51.927
	Microalga (médio teor de óleo)	50	97.800	0,1	86.515
	Microalga (alto teor de óleo)	70	136.900	0,1	121.104

**Fonte:** Mata *et al.*, (2010), adaptado pelo autor.

As microalgas constituem um grupo extremamente heterogêneo, sendo encontradas em todo o mundo, principalmente em ambientes aquáticos, mas também na superfície de todos os tipos de solos. Embora sejam normalmente organismos de vida livre, algumas espécies podem viver em associação simbiótica com outros organismos (TOMASELLI, 2004). São responsáveis por produzir aproximadamente metade do oxigênio atmosférico e usam simultaneamente, o dióxido de carbono para crescer fotoautotroficamente (TABATABAIEIA *et al.*, 2011).

Estima-se que existem cerca de 200.000 - 800.000 espécies dos quais apenas 35.000 espécies são descritas. Mais de 15.000 novos compostos provenientes da biomassa de algas foram quimicamente determinados (CARDOSO *et al.*, 2007). Durante os últimos 50 anos, tem se realizado uma investigação extensiva nas microalgas, como elas podem ser usadas numa grande variedade de processos, para a fabricação de muitos produtos importantes na economia (SPOLAORE *et al.*, 2006).

As microalgas são classificadas atendendo à sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular (SHEEHAN *et al.*, 1998, HU *et al.*, 2008) como segue:

- Diatomáceas (*Bacillariophyceae*): São predominantes no fitoplâncton marinho, mas podem ser encontradas em água doces e salobras, acumulam carbono em forma de óleos naturais.
- Algas Verdes (*Chlorophytas*): São abundantes na água doce sendo que o principal produto da sua acumulação é o amido, porém em certas condições podem produzir óleos.
- Algas azuis-verdes (*Cyanophyceae*): São parecidas com bactérias em estruturas e organização sendo que a *Spirulina* é o tipo mais conhecido.
- Algas douradas (*Chrysophyceae*): Estes tipos de algas são similares as diatomáceas, no entanto elas aparecem principalmente nas águas doces e produzem óleos naturais e carboidratos como produtos de sua acumulação.
- Algas verdes-amarelas (*Xanthophyceae*).
- Algas vermelhas (*Rhodophyceae*).
- Algas marrons (*Phaeophyceae*).
- Dinoflagelados (*Dinophyceae*).
- Picoplâncton (*Prasinophyceae e eustigmatophyceae*).

Destas, as algas verdes são as que possuem maior potencial para a produção de óleos os quais são constituídos principalmente por ácidos graxos não saturados, cuja a principal base é o glicerol (LORA *et al.*, 2012).

### Chlorophytas

O grupo das *Chlorophytas* ou algas verdes constitui o mais diversificado de todas as algas, tanto na morfologia quanto no histórico de vida, compreendendo cerca de 7000 espécies. Possuem clorofilas A e B, além de caroteno e várias xantofilas. A parede celular é composta por celulose e, assim como as plantas superiores acumulam amido ( $\alpha$ -1,4-glicano) como carboidrato de reserva. Apresentam cloroplastos envoltos por um envelope de duas membranas, sem retículo endoplasmático, e dentro dos cloroplastos, tilacóides empilhados formando granas. Os representantes deste grupo habitam os mais diferentes nichos, estando presentes tanto em águas doces quanto marinhas, além de ambientes terrestres. O grupo engloba representantes macroscópicos e microscópicos e, na classe das *Chlorophyceae*, onde predominam os organismos de água doce, encontram-se a ordem *Chlorococcales*, caracteriza por organismos flagelados,

livres ou em colônias, onde se situa o gênero *Chlorella* sp. (CHAPMAN, 1977; RAVEN *et al.*, 1992; BARSANTI e GUALTIERI, 2006; VASCONCELOS, 2012).

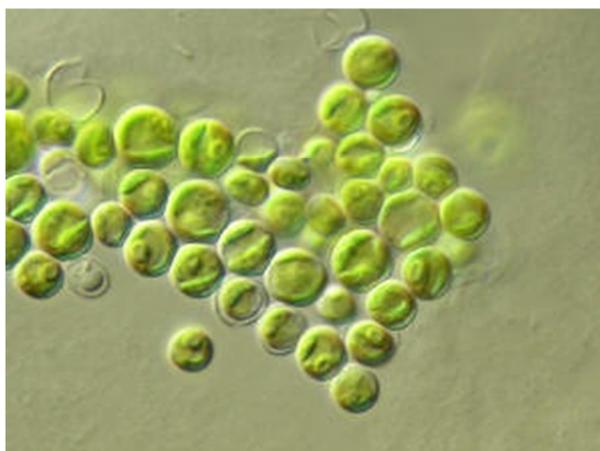
### Chlorella

O nome *Chlorella* vem da palavra grega *chloros* que significa verde, e o sufixo latino *ella* se refere ao seu tamanho microscópico. É uma microalga unicelular que cresce em água doce e tem sido encontrada na terra desde o período pré-cambriano a mais de 2 bilhões de anos atrás e desde então a sua integridade genética manteve-se constante. *Chlorella vulgaris* é capaz de acumular quantidades importantes de lipídios, especialmente depois de privação de nitrogênio, com um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biodiesel (CONVERTI *et al.*, 2009, ZHENG *et al.*, 2011).

### Chlorella vulgaris

A espécie *Chlorella vulgaris* é uma microalga unicelular que habita água doce ou meios estuarinos, pertencente à divisão *Chlorophyta*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae*, utiliza a energia da luz e dióxido de carbono para crescer, com maior eficiência fotossintética e produção de biomassa do que plantas terrestres, na Figura 4 e apresentada a imagem da microalga *Chlorella vulgaris*. Pode formar colônias, acumular pigmentos como clorofila a e b,  $\beta$ -caroteno e xantofilas. A sua forma de reserva de carbono intracelular é constituído por amido. Algumas espécies de microalgas sob condições ambientais adversas, como estresse nutritivo (falta de nitrogênio ou fósforo), podem acumular lipídeos (MIAO e WU, 2006; WILSON e HUNER, 2000).

**Figura 4 - *Chlorella vulgaris***



Fonte: [http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955\\_Chlorella\\_vulgaris.htm](http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm)

*Chlorella vulgaris* cultivada em condições ideais se multiplica por autoesporulação que é a reprodução assexuada mais comum em algas, quatro células-filhas tem sua própria parede celular formada em 24 horas no interior da parede celular da célula mãe. Após a maturação destas células recém-formadas, a mãe rompe a parede celular, permitindo a libertação das células filhas e o restante da célula-mãe será consumido como alimento pelas células-filhas recém-formadas (YAMAMOTO *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2005; SAFI *et al.*, 2014).

### **2.5.1 Microalga como matéria prima para produção de biodiesel**

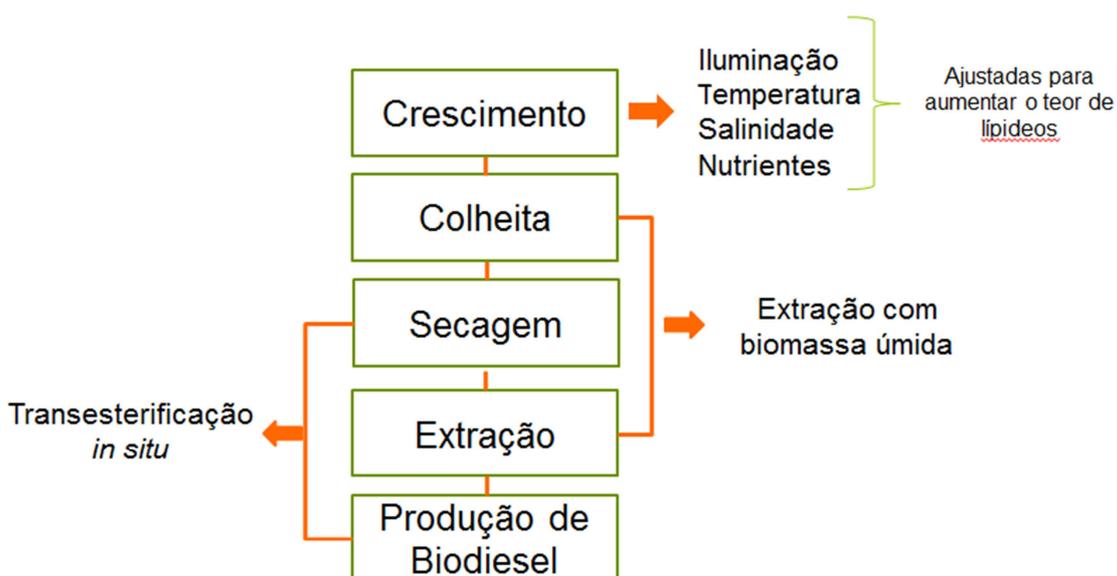
As primeiras iniciativas de cultivo de algas datam dos anos 1950, em instalações montadas na cobertura de edifícios do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT). Durante os anos 1950 e 1960 verificou-se a possibilidade de obter combustíveis a partir das algas (KAJAN *et al.*, 1994). O interesse no uso de microalgas para energias renováveis aumentou em 1970 durante a primeira crise do petróleo (SPOLAORE *et al.*, 2006). Nos anos 1980 foram desenvolvidos programas de pesquisa nesta área nos Estados Unidos, Tchecoslováquia, Alemanha, Israel, Austrália, Peru e Cuba (KAJAN *et al.*, 1994).

A falta de estabilidade dos preços do petróleo devido a sua escassez, aliado com a necessidade de reduzir as emissões de gases poluentes e o efeito estufa, e o alto valor do biodiesel produzido com matéria prima de primeira e segunda geração, desperta um novo interesse na produção de biodiesel utilizando microalgas, matéria prima de terceira geração (BARCLAY, 2005; KANEL e GUELCHER, 1999). Embora não seja rentável

ainda para competir com o diesel fóssil sem apoio adicional, como subsídios do governo, pesquisas, tanto na área acadêmica quanto na industrial, estão sendo realizadas para transformá-lo em um biocombustível economicamente viável (KANEL e GUELCHEER, 1999; YOKOCHI *et al.*, 2003; BIJL *et al.*, 2004).

A Figura 5 apresenta o fluxograma dos processos utilizados desde o crescimento da microalga até a produção do biodiesel. Dependendo do tipo de processo algumas etapas podem não ser realizadas. Os processos que utilizam biomassa úmida, não necessitam do processo de secagem, da colheita vai direto para a extração, na transesterificação direta elimina-se a etapa de extração.

**Figura 5** - Fluxograma do processo utilizado desde o crescimento da microalga até a produção do biodiesel.



FONTE: Autor

Durante o crescimento pode-se induzir o acúmulo de quantidade de substâncias lipídicas em muitas espécies de microalgas contribuindo para a obtenção de óleo com alto rendimento (SHEEHAN *et al.*, 1998). O teor de lipídeos médio em microalgas varia entre 1 e 70%, mas sob certas condições algumas espécies podem alcançar 90% do peso seco (LI *et al.*, 2008; CHISTI *et al.*, 2007; SPOLAORE *et al.*, 2006), apresentando uma ótima alternativa para obtenção de biodiesel a partir dessa biomassa.

A Tabela 3 apresenta o conteúdo lipídico, o perfil lipídico e de produtividade de biomassa de diferentes espécies de microalgas de água doce e marinhas, mostrando as diferenças entre várias espécies (LI *et al.*, 2008; RINCHMOND 2004; RENAUD *et al.*, 1999; CHISTI *et al.*, 2007; RODOLFI *et al.*, 2009; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Diferença nutricional e fatores ambientais de cultivo podem afetar as fases de crescimento e a composição de ácidos graxos. Estudos também relataram diferenças entre a composição de ácidos graxos de várias espécies de algas (ÔTLES e PIRE, 2001; POISSON *et al.*, 2002; PRATOOMYOT *et al.*, 2005; NATRAH *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2008; GOVEIA e OLIVEIRA, 2009).

Diferença nutricional e fatores ambientais de cultivo podem afetar as fases de crescimento e a composição de ácidos graxos. Estudos também relataram diferenças entre a composição de ácidos graxos de várias espécies de algas (ÔTLES e PIRE, 2001; POISSON *et al.*, 2002; PRATOOMYOT *et al.*, 2005; NATRAH *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2008; GOVEIA e OLIVEIRA, 2009).

Seja em ambiente natural ou em cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação de fatores biológicos, onde as taxas metabólicas das espécies e a influência de outros organismos são consideradas; de aspectos físico-químicos, como iluminação, temperatura, salinidade e nutrientes são retratados (RAVEN, 2001).

Após a colheita e a secagem das microalgas segue-se o rompimento celular das células de microalgas para a liberação dos metabólitos de interesse. Vários métodos podem ser utilizados, dependendo da parede celular das microalgas e sobre a natureza do produto a ser obtido por ação mecânica (por exemplo, homogeneizadores de células, moinhos de esferas, ultrassom, autoclave e secagem por spray) ou de ação não-mecânica (por exemplo, congelamento, solventes orgânicos, choque osmótico e reações ácido-base e enzimática).

**Tabela 3** – Conteúdo lipídico e produtividade de biomassa das diferentes espécies de microalgas.

Espécies de microalgas marinhas ou de água doce	Área produzida de biomassa (g/m <sup>2</sup> /dia)	Volume em produção de biomassa (g/L/dia)	Conteúdo lipídico % peso seco de biomassa	Produção lipídica (mg/L/dia)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	11,5-17,4	–	24,0-31,0	–
<i>Botryococcus braunii</i>	3	0,02	25,0-75,0	–
<i>Chaetoceros muelleri</i>	–	0,07	33,6	21,8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	–	0,04	14,6-16,4/39,8	17,6
<i>Chlorella emersonii</i>	0,91-0,97	0,036-0,041	25,0-63,0	10,3-50,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	–	2,0-7,7	14,6-57,8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	–	0,23-1,47	19,0-22,0	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,57-0,95	0,02-0,20	5,0-58,0	11,2-40,0
<i>Chlorella sp.</i>	1,61-16,47/25	0,02-2,5	10,0-48,0	42,1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	72,5/130	2,90-3,64	2	–
<i>Cryptocodinium cohmi</i>	–	10	20,0-51,1	–
<i>Dunaliella salina</i>	1,6-3,5/20-38	0,22-0,34	6,0—25	116
<i>Dunaliella primolecta</i>	14	0,09	23,1	–
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	–	0,12	16,7-71,0	–
<i>Dunaliella sp.</i>	–	–	17,5-67,0	33,5
<i>Ellopsoidion sp.</i>	–	0,17	27,4	47,3
<i>Euglena gracilis</i>	–	7,7	14,0-20,0	–
<i>Haemacoccus pluvialis</i>	10,2-36,4	0,05-0,06	25	–
<i>Isochrysis galbana</i>	–	0,032-1,60	7,0-40,0	–
<i>Isochrysis sp.</i>	–	0,08-0,17	7,1-33	37,8
<i>Monodus subterraneus</i>	–	0,19	16	30,4
<i>Monallanthus salina</i>	12	0,08	20,0-22,0	–
<i>Nannochloris sp.</i>	–	0,17-0,51	20,0-56,0	60,9-76,5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	–	0,37-0,48	22,7-29,7	84,0-142,0
<i>Nannochloropsis sp.</i>	1,9-5,3	0,17-1,43	12,0-53,0	37,6-90,0
<i>Neochloris oleobudans</i>	–	–	29,0-65,0	90,0-134,0
<i>Nitzschia sp.</i>	8,8-21,6	–	16,0-47-0	–
<i>Oocystis pusilla</i>	40,6-45,8	–	10,5	–
<i>Pavlova salina</i>	–	0,16	30,9	49,4
<i>Scenedesmus obliquus</i>	–	0,004-0,74	11,0-55,0	–
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	–	0,19	1,9-18,4	35,1
<i>Scenedesmus sp.</i>	2,43-13,52	0,03-0,26	19,6-21,1	40,8-53,9
<i>Skeletonema sp.</i>	–	0,09	13,3-31,8	27,3
<i>Skeletonema costatum</i>	–	0,08	13,5-51,3	17,4
<i>Spirulina plantensis</i>	1,5-14,5/24-51	0,06-4,3	4,0-16,6	–
<i>Spirulina máxima</i>	25	0,21-0,25	4,0-9,0	–
<i>Thalassiosira pseudômona</i>	–	0,08	20,6	17,4
<i>Tetraselmis suecica</i>	19	0,12-0,32	8,5-23	27,0-36,4
<i>Tetraselmis sp.</i>	–	0,3	12,6-14,7	43,4

FONTE: Mata *et al.* (2010), adaptado pelo autor.

As algas como matéria prima para o biodiesel estão em estágios preliminares de pesquisa, mas mostram um imenso potencial para oferecer alternativas como matéria prima para combustíveis de nova geração. A quantidade de lipídeos produzidos por microalgas em relação ao peso seco da biomassa pode ser de 15 a 300 vezes maior do que o derivado de plantas. No entanto, seu cultivo e extração de óleo, juntamente com otimização de parâmetros importantes (luz, pH, temperatura, nutrientes) para um elevado rendimento de óleo com baixo custo é presentemente um grande desafio (XIN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2014).

Após a produção da microalga é necessário a extração do óleo caso o biodiesel não for produzido por transesterificação direta. Os métodos de extração empregados no passado eram bem simplificados e os produtos obtidos a partir destes nem sempre eram óleos 100% puros. Além disso, as características de um óleo podem mudar conforme o método empregado, tendo em vista que as suas propriedades químicas poderão ser totalmente alteradas, dependendo das condições a qual ele é submetido (SILVA, 2006).

Nas primeiras décadas do século XX utilizavam-se prensas para extração de oleaginosas, que, embora extraíssem um óleo de boa qualidade, deixavam resíduos no material sólido. Tais resíduos implicavam na perda de óleo, afetando a qualidade da torta, que é também um dos produtos efluentes do extrator (BOSS, 2000). Atualmente, a quantidade de solvente usada pelas indústrias em processos de extração convencional é estimada em aproximadamente, um milhão de toneladas por ano (MENDES *et al.*, 2007). Para extração do óleo normalmente é utilizado um solvente e realizada diretamente a partir da biomassa liofilizada, por ser um método de extração rápido e eficiente, reduz pouco a degradação. Vários solventes podem ser utilizados, tais como hexano, etanol (96%), ou uma mistura de hexano e etanol (96%), sendo possível se obter até 98% de extração quantitativa de ácidos graxos purificados (RICHMOND, 2004). A grande limitação do processo é a eliminação do hexano após a extração, e a eventual degradação térmica do óleo. Com isso, diversos autores (BRUNNER 1994; ACOSTA *et al.*, 1995; MARRONE *et al.*, 1998; ESQUIVEL *et al.*, 1999, HASSAN *et al.*, 2000 ILLÉS *et al.*, 2000; HEGEL *et al.*, 2007, HAMDAN *et al.*, 2008, FREITAS *et al.*, 2008. DONG *et al.*, 2008) têm proposto a substituição do processo tradicional pelo processo de extração com fluido supercrítico. Isso pode ser explicado pelos triglicerídeos serem facilmente solúveis em CO<sub>2</sub> supercrítico a 40°C e em pressões próximas de 280 bar (REVERCHON e MARCO, 2006).

A extração com fluido supercrítico é definida por Williams (1981), como sendo uma operação unitária, onde são empregados solventes acima de seus pontos críticos para extraírem componentes solúveis de uma mistura. Tem sido amplamente estudada em diversas áreas do conhecimento, tendo como destaque a sua utilização na extração de compostos de fontes naturais.

Mubarak *et al.* (2015) em uma revisão sobre métodos de extração de óleo de microalga eles comparam os métodos de extração e quais as vantagens e desvantagens que cada método relatado no estudo. A Tabela 4 apresenta a comparação entre os métodos de extração para vários tipos de microalgas, usando diferentes solventes e diversas condições de operação. A Tabela 5 descreve quais as vantagens e desvantagens dos diferentes métodos estudados.

O grande desafio para a produção industrial e comercialização do biodiesel a partir de microalgas é o alto custo de extração do óleo da microalga para após ser convertido em biodiesel. Wahidin *et al.* (2014) e Lardon *et al.* (2009) relataram que 90% de energia consumida para a conversão de biodiesel a partir da biomassa de microalgas está no processo de extração de lipídios. Na tentativa de reduzir o consumo de energia pode se utilizar a transesterificação *in situ* que reduz uma etapa do processo.

## **2.6 Transesterificação *in situ***

A transesterificação *in situ* combina a etapa de extração do óleo com a reação de transesterificação fazendo tudo em uma única etapa, simplificando o processo de conversão, reduzindo o número de operações unitárias e os custos do produto final (biodiesel) (HAAS e WAGNER, 2011). De acordo com a Salam *et al.* (2016) a transesterificação *in situ* demonstrou-se tecnicamente viável para varias espécies de microalga marinhas e de água doce. No entanto eles observaram, uma grande desvantagem em relação a razão molar metanol:óleo que é bastante elevada para obter um rendimento desejado, podendo chegar a 1000: 1.

**Tabela 4** - Métodos de extração de óleo de microalga.

Método de extração	Solvente usado	Condições de operação (temperatura, pressão, tempo)	Microalga usada	Rendimento Lipídio (%)
Supercrítico	CO <sub>2</sub> e etanol	40°C, 35 MPa, 30 min	<i>Shizochytrium limacinum</i>	33,9
	CO <sub>2</sub>		<i>Pavlova sp.</i>	34
Soxhlet	N-Hexano	40°C, 0,1MPa, 18 h	<i>Shizochytrium limacinum</i>	45
	Diclorometano		<i>Nannochloropsis oculata</i>	9
	N-Hexano	<i>Nannochloropsis oculata</i>	5,79	
	Etanol	<i>Nannochloropsis oculata</i>	40,9	
	N-Hexano	<i>Pavlova sp.</i>	45,2	
	Éter de petróleo	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8,2	
Mistura de solvente	Etanol	200°C, 0,1 Mpa, 2h	<i>Synechocystis PCC 6803</i>	48
	Hexano/etanol		<i>Synechocystis PCC 6803</i>	52
	Hexano/isopropanol		<i>Synechocystis PCC 6803</i>	36
	Clorofórmio/metanol		<i>Synechocystis PCC 6803</i>	50
	Clorofórmio/metanol/água		<i>Synechocystis PCC 6803</i>	42
Fluido pressurizado	N-Hexano	60°C, 10-12MPa, 10 min	<i>Nannochloropsis oculata</i>	6,1
	N-Hexano/prona-2-ol (2:1 vol.%)		<i>Nannochloropsis oculata</i>	20
	Etanol 96%		<i>Nannochloropsis oculata</i>	36
Ultrassom assistida	Éter de petróleo	Frequência 40 KHz, 1h	<i>Nannochloropsis oculata</i>	3,3
Microalga Úmida	Hexano	90°C, 0,1 MPa,	<i>Chlorella e Scenedesmus sp.</i>	59,3

**FONTE:** Mubarak *et al.* (2015).

**Tabela 5** - Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de extração de óleo de microalga.

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Prensa	Fácil de usar, Não necessita solvente	Grande quantidade de biomassa, Processo lento
Ultrassom assistida	Redução do tempo de extração, Redução do consumo de solvente, A uma maior penetração do solvente na parede celular	Alto consumo de energia, Difícil de escalar
Micro ondas assistida	Mais econômico, Redução do tempo de extração, Redução do uso de solvente, Melhora o rendimento de extração	A filtração ou centrifugação são necessárias para remover o resíduo sólido, Micro ondas pode ser ineficiente quando o solvente for apolar ou volátil, Gasta energia para recuperar o solvente
Extração por solvente	Simples e barato, Bom para pequena escala, Alta eficiência	Tempo de extração e longo, Grande volume de solvente necessário, é tóxico e inflamável
Supercrítico	Redução do tempo de extração, Sintonizável solvatação devido à flexibilidade de mudar de pressão e temperatura para maior seletividade, solvente de baixa toxicidade, Equilíbrio favorável de transferência de massa, devido às propriedades de difusão e viscosidade intermediário do fluido, Produção do extrato livre de solvente	Alto custo do processo associado com a infraestrutura e operação
Microalga úmida	Não gasta energia para secagem da biomassa, Redução do uso de solvente	A qualidade do lipídeo não é tão boa quanto o que é extraído de biomassa seca

**FONTE:** Mubarak *et al.* (2015).

## 2.7 Biodiesel a partir de microalgas

Vários estudos sobre transesterificação direta ou em duas etapas de diferentes microalgas foram realizados na literatura. Nagle e Lemke (1990) analisaram dois catalisadores, para a conversão do óleo de microalgas: catalise ácida (ácido clorídrico, HCl) e catalise alcalina (hidróxido de sódio, NaOH). Estes autores mostraram que o uso de catalisadores ácidos para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) a partir do óleo de microalgas resultou em maiores rendimentos do produto do que os catalisadores alcalinos sob as mesmas condições de reação.

Na produção de biodiesel da transesterificação alcalina o baixo rendimento é um dos principais desafios enfrentados. Acredita-se que a transesterificação enzimática pode melhorar o rendimento do biodiesel. As enzimas que melhor atuam na transesterificação são as lipases, elas podem ser categorizadas em três classes com base na sua especificidade e seletividade como lipases específicas posicionais; lipases específicas do tipo de ácidos graxos e lipases específicas para uma determinada classe de acilgliceróis (mono- di-triglicéridos) (TEO *et al.*, 2014).

Johnson e Wen (2009) testaram a produção de biodiesel a partir de microalga usando diferentes solventes (Metanol, clorofórmio, hexano e éter de petróleo). Quando a biomassa seca por congelamento foi utilizada como matéria prima, o método de duas fases resultou em 57% de rendimento de biodiesel (com base na biomassa de algas) com um teor de éster metílico de ácidos graxos (EMAG) de 66,37%. O método de uma fase (com clorofórmio, hexano ou éter de petróleo usado na transesterificação) conduziu a um elevado rendimento de biodiesel bruto, ao passo que apenas transesterificação à base de clorofórmio levou a um elevado teor de EMAG. Quando a biomassa úmida foi utilizada como matéria prima, o processo de uma só fase resultou em um rendimento muito inferior de biodiesel.

Ehimen *et al.*, (2010) produziram biodiesel através de transesterificação *in situ* da biomassa da microalga *Chlorella*, avaliando diferentes parâmetros de reação entre eles: temperaturas, razão molar do álcool, tempos e umidade da biomassa. A melhor conversão de EMAG obtida foi de 88% , após uma reação de 2 horas, utilizando uma concentração de ácido sulfúrico de 0,04 mol, 500:1 mol de metanol e uma temperatura de 90°C. A secagem da biomassa também foi observada e possui um importante papel, com o aumento no teor de umidade da biomassa, obteve-se redução nos rendimentos de

conversão de EMAG. Portanto, a secagem de biomassa pode ser necessária para à produção de biodiesel pelo processo *in situ*. No entanto, o custo energético da recuperação do excesso de reagentes (álcool) neste processo, assim como o aumento nas exigências de purificação EMAG, vem a limitar a redução de custos, uma das principais razões que favorece a utilização do método de transesterificação *in situ*.

Transesterificação direta da microalga *Botryococcus braunii* com refluxo contínuo de metanol foi estudada por Hidalgo *et al.* (2015), mostrando um alto rendimento FAME (~ 80%). A incorporação de hexano como co-solvente apresentou um efeito positivo sobre o rendimento de FAME, que passou de 82% (usando 104% v/v de metanol) para 95% quando foi adicionado 47% (v/v) de hexano. No entanto, a seletividade para o lipídeo não saponificável, tais como o esteról aumentou, afetando negativamente a qualidade do biodiesel.

A transesterificação não catalítica foi estudada por Liu *et al.*, (2015), os quais obtiveram um aumento na conversão de 19,3% para 95,5% quando utilizaram uma razão molar óleo:álcool de 1:9, em 4 minutos de reação, a 200 bar, e a temperatura de 300 a 400°C. A microalga utilizada para o estudo foi a *Chlorella protothecoides*. Nan *et al.*, (2015) otimizaram a produção de biodiesel por transesterificação não catalítica com metanol e etanol supercrítico, usando a microalga *Chlorella protothecoide*, encontrando como condições ideais de processo para EMAGs (rendimento 90,8 %) temperatura de 320°C, pressão 152 bar, razão molar 19:1, tempo de exposição 31 min, e 7,5% em peso de óleo e para EEAGs (rendimento 87,8 %) 340°C, 170 bar, 33: 1, 35 por minutos, 7,5% em peso.

## 2.8 Considerações sobre o estado da arte

As microalgas têm vantagens sobre as fontes convencionais de biocombustível, há inúmeros relatos na literatura sobre a produção de biodiesel através da transesterificação direta onde ocorrem extração e reação numa única etapa. Mas os métodos de transesterificação direta relatados necessitam um maior teor de solvente para facilitar a extração aumentando assim o rendimento. No intuito de diminuir a quantidade de solvente utilizado durante a transesterificação direta este trabalho busca produzir biodiesel a partir de biomassa de microalga *Chlorella vulgaris*, fazendo uso de um catalisador enzimático (Novozym 435) associado ao uso de fluido pressurizado (propano).

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho, relacionados à produção de biodiesel enzimático utilizando biomassa de microalga.

#### 3.1 Especificação dos materiais

Para a realização deste trabalho, foi utilizada uma lipase comercial de origem microbiana (*Novozym 435*). A lipase é produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup>. Este produto é fornecido com quantidade de água entre 1-2%. A enzima Novozym 435 foi escolhida com base no trabalho de Feihmann *et al.* (2006), o qual ao avaliar o comportamento da atividade de duas lipases (Novozym 435 e Lipozyme IM) em propano pressurizado, observaram desempenho superior da enzima Novozym 435.

Como substratos foram utilizados:

- Biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* (seca) cedida pela Universidade Federal de Pelotas utilizada para o experimento preliminar;
- Biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* (seca) adquirida da indústria Allma Natural Benefits utilizada para os demais experimentos; a Tabela 6 apresenta a caracterização da microalga segundo fabricante:

**Tabela 6** - Caracterização dos nutrientes da microalga *Chlorella vulgaris*

Nutrientes	
Carboidratos	5,7g/100g
Fibra	12,2g/100g
Teor lipídico	10,7g/100g
Proteína	57,86g/100g
Cinzas	10,1/100g
Umidade	5,7g/100g
Valor energético	366 kcal

Fonte: Allma Natural Benefits

- Álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza).
- Propano (White Martins 99,5% de pureza, fase líquida).

Na quantificação dos produtos da reação foram usados padrões comerciais dos ésteres majoritários e o padrão interno heptadecanoato de metila, (Sigma-Aldrich), como solvente n-heptano (Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza).

Para a determinação da atividade enzimática os seguintes reagentes/ solventes foram utilizados: acetona PA ACS (Vetec, 99,5%), álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e hexano (Nuclear, P.A). Ácido láurico (Vetec, 98% CG), álcool n-propílico normal (Nuclear, P.A 99,5%) e hidróxido de sódio NaOH (Nuclear), foram utilizados como substratos para dosagem da atividade de esterificação das lipases.

### 3.2 Determinação da atividade enzimática

O procedimento adotado para a determinação da atividade da enzima *Novozym 435* foi o descrito por Oliveira *et al.* (2006). A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e álcool n-propílico, à temperatura de 60 °C, com a enzima (0,195 g) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (60°C). Alíquotas de 150 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no início e após 40 minutos de reação e diluídas em 20 mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e a extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01 M. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A Equação 1 (OLIVEIRA *et al.* 2006) foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$Atividade \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{[(V^{0NaOH}) - (V^{40NaOH})]}{t \times m_a} \times M \times 10^3 \quad (1)$$

Onde:

$M$  = molaridade da solução de hidróxido de sódio;

$V^{0NaOH}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra no início da reação (mL);

$V^{40 NaOH}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra após 40 minutos de reação (mL);

$ma$  = massa de enzima utilizada na reação (g);

$t$  = tempo de reação (min).

A atividade da enzima foi determinada no início e ao final das reações em todos os experimentos realizados, objetivando o acompanhamento da alteração da atividade da *Novozym 435* quando do seu emprego na reação de transesterificação e de esterificação.

### 3.3 *Produção de éster etílicos a partir da biomassa de Chlorella vulgaris.*

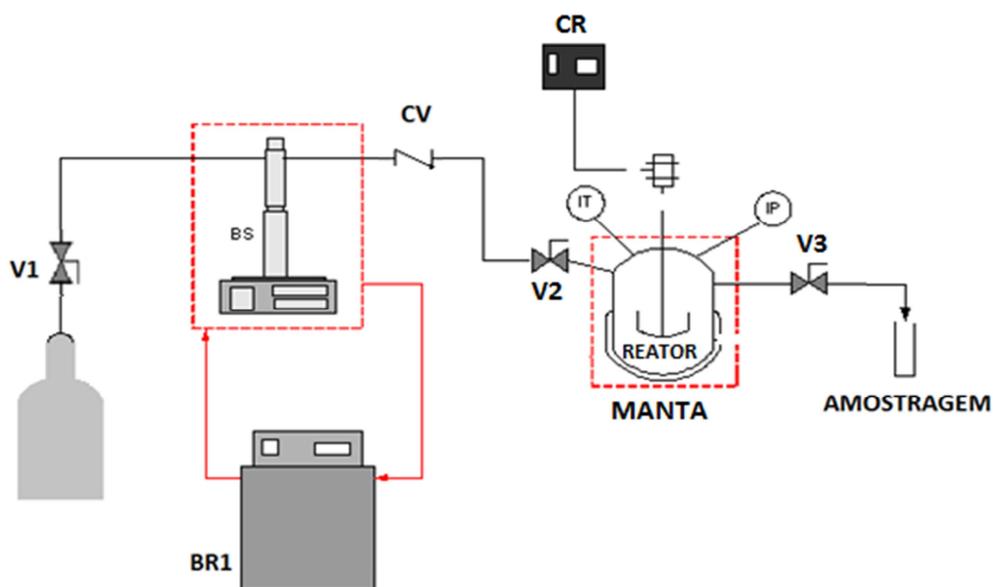
O sistema experimental utilizado para a produção de éster etílico com biomassa de *Chlorella vulgaris*, lipases imobilizadas e propano pressurizado era composto por um reator de 100 mL (PARR 4843), com agitação mecânica, uma manta de aquecimento para controle da temperatura, um cilindro de gás propano e uma bomba de seringa (ISCO, modelo 260D). De acordo com as especificações do fabricante, o reator é projetado para operar em pressões de até 210 bar. Um banho termostático foi acoplado a bomba seringa para manter constante a temperatura (5°C) de alimentação do solvente, permitindo assim avaliar a massa de solvente adicionada ao reator. Válvulas de esfera, de agulha e de uma via (*check-valves*) e indicadores de pressão e temperatura complementavam a unidade experimental. A Figura 6 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental.

Os seguintes passos foram realizados no procedimento experimental: inicialmente o banho BR1, conectado a bomba de alta pressão (BS), foi ajustado a temperatura 5 °C. Após o banho termostático atingir a temperatura estabelecida, a válvula (V1) conectada ao cilindro de propano era aberta e adicionava-se uma carga deste solvente na bomba (BS), a fim de que o gás propano estivesse liquefeito. Este procedimento demorava em torno de 2 horas. Em seguida as válvulas V2 e V3 eram fechadas impedindo a passagem de gás para a linha onde estava conectado o reator.

Os substratos (etanol e biomassa) após pesados em uma balança de precisão (0,0001 g precisão) foram adicionados ao reator e na sequência adicionou-se a enzima.

Posteriormente o sistema foi fechado, iniciando a agitação. O aquecimento foi realizado por meio de uma manta na temperatura determinada no planejamento de experimentos.

**Figura 6** - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para produzir ésteres etílicos a partir da biomassa de *Chlorella vulgaris*: cilindro de fluido, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1) banho termostático, (V1) válvula de alimentação para a bomba de alta pressão, (V2) válvula de alimentação do reator, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (CR) comando do controle de agitação, (V3) válvula de amostragem.



Fonte: Autoclave Engineering

A válvula V1 foi fechada e pressurizou-se a bomba de seringa, através de comando na bomba de líquido, até a pressão estabelecida para o experimento. Após atingir a pressão desejada, anotava-se o volume de propano da bomba, afim de controlar o volume que era adicionado no reator. Na sequencia a válvula V2 foi aberta com fluxo constante de 20 mL/min. Ao atingir a pressão desejada o volume de propano adicionado era computado pelo decaimento do volume de solvente na bomba de seringa. O procedimento para preencher o reator com solvente e pressurizar o sistema demandava em média 5 min, após anotava-se o início do tempo reacional. O fluxo da bomba (BS), a pressão (IP) e a temperatura (IT) do sistema foram monitorados constantemente.

Ao final do tempo de reação fechava-se a válvula V2, retirava-se a amostra para análise cromatográfica pela válvula V3, ao mesmo tempo que a despressurização do

sistema era realizada. O sistema demandava em média 1 hora para total despressurização. O conteúdo do reator era peneirado para separar a enzima da biomassa e após lavava-se a enzima com n-heptano.

### 3.3.1 Experimento preliminar

Este experimento teve como objetivo verificar a possibilidade de produzir ésteres etílicos a partir da biomassa de *Chlorella vulgaris*, a microalga foi produzida especificamente para ser usada em reações de biodiesel, porém só teve microalga suficiente para o teste preliminar, utilizando propano como solvente. Como não foi encontrado relatos na literatura sobre biodiesel de microalga utilizando propano como solvente para o primeiro experimento foi utilizada a melhor condição avaliada por Dalla Rosa *et al.* (2008), para obtenção de biodiesel a partir de óleo de soja utilizando fluido pressurizado (propano) e enzima Novozym 435. As condições utilizadas foram: pressão de 50 bar, tempo de 8 horas, concentração de enzima de 20%, agitação de 1000 rpm, temperatura de 65°C, razão molar óleo:etanol (1:6) e razão mássica solvente:substrato (2:1). Os demais experimentos foram realizados com uma microalga que não foi produzida especificamente para biodiesel, mas pertence a mesma linhagem da microalga (*Chlorella vulgaris*) utilizada no este preliminar.

### 3.3.2 Planejamento experimental

Para estudo do efeito da temperatura, pressão e tempo na conversão de ésteres etílicos a partir da biomassa de *Chlorella vulgaris* utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos que é uma ferramenta estatística que permite avaliar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar possíveis interações entre variáveis de um processo. Além disso, essa ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com objetivo de maximizar ou minimizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (YUN e BAI, 2008; BURKET *et al.*, 2005; RODRIGUES e IEMMA, 2005 ).

#### a) Efeito das variáveis pressão, temperatura e tempo sobre a conversão em éster de biomassa de microalga

Com base no experimento preliminar realizou-se um planejamento composto central  $2^3$  tendo como objetivo avaliar os efeitos das variáveis do processo (pressão,

temperatura e tempo de reação) sobre a conversão em ésteres a partir da reação direta de biomassa de microalga em biodiesel. A variável tempo de reação foi avaliada para tentar diminuir o tempo de reação, economizando solventes e substratos. Com base no experimento do preliminar a pressão e temperatura foram avaliados numa faixa de pressão e temperatura, onde a pressão e a temperatura do ponto central foi próxima ao experimento do anexo pressão 55 bar e temperatura 65°C. A Tabela 7 apresenta as variáveis e níveis utilizados.

**Tabela 7** - Variáveis e níveis experimentais avaliados para obtenção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Pressão (bar)	30	55	80
Temperatura (°C)	50	65	80
Tempo (horas)	1	4,5	8

As variáveis fixadas foram, agitação 1300 rpm, razão molar óleo:etanol 1:12, concentração enzimática 20%.

#### b) Delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

Após análise estatística do planejamento experimental (a), realizou-se um delineamento composto central rotacional completo 2<sup>2</sup> (DCCR), totalizando 11 experimentos, visando otimizar a conversão em biodiesel no sistema reacional estudado. O tempo total de reação foi fixado em 8 horas e as faixas de temperatura e pressão de enzima estudadas nesta etapa são apresentadas na Tabela 8. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 5.0 Statsoft Inc. e, através da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos destas variáveis para máxima produção de biodiesel.

**Tabela 8** - Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>, para otimização da produção enzimática de biodiesel a partir de biomassa de microalga.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Pressão (bar)	59,5	80	130	180	200,5
Temperatura (°C)	46,9	50	57,5	65	68,1

As variáveis fixadas foram, agitação 1300 rpm, razão molar óleo:etanol 1:12, concentração enzimática 20%, e tempo de 8 horas.

### **3.3.3 Estudo da concentração de enzima**

Em seguida ao planejamento de experimentos, realizou-se um estudo para verificar a concentração de enzima que conduziria à maior conversão em biodiesel. Com a condição já otimizada através do delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR), em 50 °C, 180 bar e razão molar (óleo/etanol) 1:12, foi variado a quantidade da enzima em 0%, 1%, 5%, 10% e 20% (m/m).

### **3.3.4 Estudo da razão molar entre os substratos**

Para verificar o efeito que a razão molar exerce sobre a conversão em ésteres realizou-se um estudo utilizando diferentes razões molares de (óleo/etanol) de 1:12, 1:18, 1:24, 1:30 e 1:36 a 50 °C e 180 bar, concentração de enzima 20%, com bases na massa do substrato, e tempo de reação 8 horas.

### **3.3.5 Estudo cinético**

Após a otimização da temperatura e pressão (50°C, 180 bar) e realizado o estudo da melhor razão molar óleo:etanol (1:24), e concentração enzimática (20%) realizou-se uma cinética da reação, para determinar qual o tempo que ocorre o melhor rendimento de ésteres etílicos, nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 horas, para determinar o melhor tempo para a conversão de ésteres etílicos utilizando biomassa de *Chlorella vulgaris*.

### **3.3.6 Avaliação de sucessivos ciclos de reuso do biocatalisador *Novozym 435***

Para avaliar a capacidade de reuso do biocatalisador *Novozym 435* em sucessivas reações foi utilizada a condição experimental de 7 horas de reação, 50 °C, 180 bar, razão molar (óleo/etanol) 1:24 e concentração de enzima de 20% (m/m da enzima *Novozym 435*, em relação à massa de substrato).

Para recuperar a enzima ao final de cada reação, o biocatalisador imobilizado foi separado da biomassa utilizando peneiras. Em seguida, a enzima foi lavada duas vezes com 10 mL de n-heptano e a suspensão obtida filtrada a vácuo (CASTRO E ANDERSON, 1995). Posteriormente secou-se a enzima em estufa (modelo JP 101,

marca J. Prolab) a 40 °C durante 1 hora. A enzima recuperada foi mantida em dessecador por 24 horas, para a utilização na próxima reação de transesterificação. Após este período, a atividade da mesma foi determinada para verificar possíveis perdas durante a reação e torná-la apta para a reutilização.

A medida de atividade da enzima foi realizada no início, antes de ser utilizada pela primeira vez, e ao final das reações com a enzima recuperada. Antes de iniciar o procedimento de medida de atividade, as enzimas imobilizadas foram secas em estufa a 40 °C durante 1 hora (OLIVEIRA *et al.*, 2006), para eliminação de possível umidade livre. A enzima foi utilizada até manter 50 % de sua atividade original.

### 3.4 Determinação da conversão em ésteres

A determinação de ésteres foi realizada por cromatografia gasosa (GC/FID Aggient technologies 7890A) equipado com uma coluna capilar modelo DB-WAX (contendo polietileno glicol na fase estacionária), de 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,32 mm, nas seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 150°C, permeado por 1 minuto nesta condição, taxa de aquecimento de 10° C/min nesta condição. A temperatura do injetor e do detector foi estabelecida em 250° C. A quantidade de solução de amostra foi de 1µL. Seguindo as especificações da Norma Européia EN 14103, segundo documento oficial publicado em 01/06/01 com número de projeto 1999/00751. A Equação 2 expressa, em porcentagem, a conversão em ésteres baseada Norma Européia EM 14103:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ei}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei} \times V_{ei}}{W} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$\sum A$  = área total de picos entre os padrões C<sub>14</sub> e C<sub>24:1</sub>;

A<sub>ei</sub> = é a área correspondente ao pico do padrão interno, C<sub>17:0</sub>;

C<sub>ei</sub> = é a concentração, em mg/mL, da solução de padrão interno, C<sub>17:0</sub>;

V<sub>ei</sub> = é o volume da solução de padrão interno adicionado à amostra;

W = é a massa, em mg, da amostra de biodiesel.

A conversão do triglicerídeo em éteres (rendimento em ésteres) foi calculada conforme exposto por Silva *et al.*, (2009), que considera a estequiometria da reação, mais precisamente a relação entre a concentração de ésteres obtida via análise cromatográfica com o teor de glicerol para 100% de conversão em ésteres.

### ***3.5 Aparato experimental para extração do óleo de microalga para análise cromatográfica da composição de ácidos graxos***

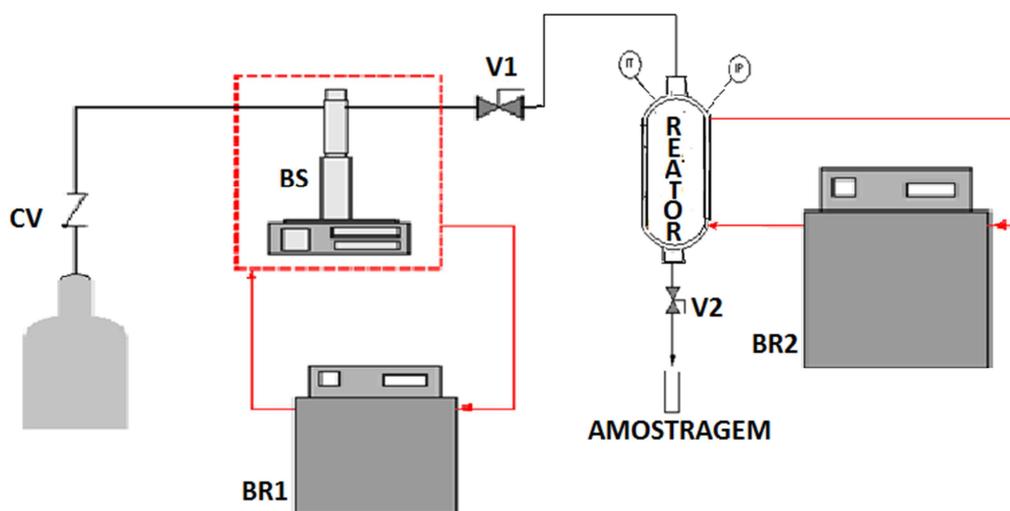
O sistema operacional para a extração do óleo da microalga consiste em um extrator de aço inox (100mL), encamisado que está acoplado a um banho termostático para controle da temperatura desejada. As extremidades do extrator são rosqueadas, para manter a biomassa nas duas extremidades existem telas de aço-inox. A unidade esta conectada a uma linha de gás (propano), uma bomba de alta pressão e um banho termostático acoplado a bomba seringa para manter constante a temperatura de alimentação do solvente. Para controle de pressão e temperatura foram utilizadas válvulas de esfera, de agulha e de uma via (*check-valves*) e indicadores de pressão e temperatura. A Figura 7 demonstra o diagrama esquemático do aparato experimental para a extração do óleo de microalga.

O procedimento experimental foi realizado ajustando a temperatura de 5 °C ao banho BR1, conectado a bomba de alta pressão (BS). Após o banho termostático atingir a temperatura estabelecida, a válvula (CV) conectada ao cilindro de gás propano era aberta e adicionava-se uma carga deste solvente na bomba (BS), a fim de que o propano estivesse liquefeito, durante 2 horas. Posteriormente, foi avaliado se as válvulas V1 e V2 estavam fechadas impedindo a passagem de gás para a linha.

O extrator era empacotado manualmente com ajuda de um funil com cerca de 20 gramas de biomassa seca, em seguida era fechado e ligava-se o banho BR2 na temperatura determinada no planejamento de experimentos esperava-se até que a biomassa chega-se na temperatura estabelecida.

Após a válvula V1 ser fechada o sistema foi pressurizado com auxílio da bomba de seringa até a pressão estabelecida para o experimento. Após 2 horas de extração do óleo, o mesmo foi retirado do extrator para determinar a composição dos ácidos graxos.

**Figura 7** - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para extração de óleo, cilindro de fluido, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1, BR2) banhos termostáticos, (V1) válvula de alimentação do reator, (V2) válvula de amostragem, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão.



Fonte: Autor

### 3.5.1 Determinação dos perfis de ácidos graxos

O mesmo planejamento utilizado no item 3.3.2 b foi repetido (delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR), totalizando 11 experimentos) para a extração do óleo de microalga a fim determinar o perfil dos ácidos graxos presentes no óleo extraído em cada condição. O tempo total de reação foi fixado em 8 horas e as faixas de temperatura (46,9 à 68,1) e pressão (59,5 à 200,5).

### 3.5.2 Determinação de ácidos graxos – Esterificação

Para determinar a composição dos ácidos graxos utilizou-se o processo de esterificação. Os ácidos graxos obtidos a partir da biomassa de microalga foram esterificados utilizando solução de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  - Vetec) – ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  - Moderna) – álcool metílico ( $\text{CH}_3\text{OH}$  - Vetec). As amostras foram esterificadas de acordo com o método adaptado de Metcalfe *et al.* 1976 e Hartman e Lago 1973

Os ácidos graxos foram colocados em um tubo de ensaio sobre um pedaço de algodão, sendo adicionado 4mL da solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$  – moderna)- $\text{CH}_3\text{OH}$  0,5N e fechado tubo de ensaio. O mesmo foi aquecido em banho maria a

temperatura de ebulição por 5 min, em seguida resfriado a temperatura ambiente sob água corrente. Posteriormente, foi adicionado 5 mL do reagente esterificante (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{CH}_3\text{OH}$ ) ao tubo e novamente fechado e agitado manualmente, aquecido em banho maria por 5min e resfriado sob água corrente. Em seguida foi adicionado 4 mL de solução saturada de cloreto de sódio ( $\text{NaCl} - \text{Cinética PA}$ ) e agitado vigorosamente por 30 segundos inserido 5 mL de hexano (p.a – Dinâmica), agitado novamente por 30 segundos. A solução foi deixada em repouso até a separação das fases orgânica e aquosa. Posteriormente, retirou-se a fase orgânica (superior) utilizando pipetas, onde estão os ésteres etílicos, injetar no cromatógrafo gasoso 1  $\mu\text{L}$  da fase orgânica.

As amostras foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas descritas no item 4.4.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo tem por objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, onde primeiramente serão apresentados os resultados referentes ao teste preliminar onde pode se verificar o potencial da microalga *Chlorella vulgaris* em conversão em éteres etílicos e posteriormente, o planejamento de experimentos, onde foram avaliados os efeitos do tempo, temperatura e pressão na conversão de ésteres. Após, serão apresentados os resultados do segundo planejamento realizado para otimizar os parâmetros pressão e a temperatura no intuito de aumentar a conversão em éster etílicos a partir da biomassa, e para isso foi fixado a variável tempo. Depois de determinada a melhor pressão e temperatura para o processo, será apresentada uma avaliação da melhor razão molar óleo:etanol e concentração enzimática. Finalizando a etapa de resultados e discussões, será apresentado um estudo cinético e de reciclo da enzima, com a condição otimizada nas etapas anteriores.

### 4.1 Teste preliminar

Um teste preliminar foi realizado para ver a possibilidade de realizar a transesterificação *in situ* utilizando propano como fluido pressurizado. Não foi encontrado nenhum relato na literatura utilizando propano como fluido pressurizado para a transesterificação *in situ* de biomassa de microalga, utilizou-se como base as condições otimizadas por Dalla Rosa *et al.* (2008) pressão de 50 bar, tempo de 8 horas, concentração de enzima de 20%, agitação de 1000 rpm, temperatura de 65°C, razão molar óleo : etanol (1:6) e razão mássica solvente : substrato (2:1). Através da análise cromatográfica calculou-se a conversão em ésteres etílicos em peso de biomassa (35,35%).

Sanchez *et al.*, (2012) obteve 17,1 % de rendimento de ésteres metílicos em condições reacionais conduzidos com uma razão molar de óleo:metanol 300:1, concentração de catalisador de 1%, a uma temperatura de 60 °C, com um tempo de 11 horas Tran *et al.*, (2012) usando uma maior concentração de catalisador (1804,65 U g<sup>-1</sup>) obtiveram uma conversão em biodiesel de 28,42% em peso de biomassa durante 48 h de reação. No experimento realizado neste trabalho uma maior conversão de ésteres (35,35%) em termos de biomassa foi encontrada durante uma reação de 8 horas, o

tempo de exposição foi menor que nos dois trabalhos relatados e foi utilizada uma concentração de álcool menor.

O teste preliminar mostrou que a transesterificação *in situ* da biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* utilizando propano como fluido pressurizado tem potencial, reduzindo uma etapa do processo (extração do óleo). Como não havia quantidade de microalga suficiente para todos os testes apenas o teste preliminar foi realizado com a microalga cedida. Para os demais experimentos a microalga *Chlorella vulgaris* foi adquirida da Indústria Allma Natural Benefits como descrito no item 4.1, permitindo ampliar a investigação dos parâmetros propostos inicialmente.

#### **4.2 Avaliação do efeito das variáveis: pressão, temperatura e tempo na conversão em ésteres etílicos**

Com base no resultado obtido no teste preliminar, um planejamento composto central  $2^3$  foi realizado, a fim de avaliar o efeito das variáveis pressão (30 à 80 bar), temperatura (50 à 80 °C) e tempo de exposição (1 à 8 h) (Tabela 7), sobre a conversão em ésteres etílicos da biomassa da microalga. As variáveis concentração da enzima (20%), razão molar óleo:etanol (1:12) e agitação (1300 rpm) foram mantidas fixas. A razão molar óleo:etanol foi aumentada, pois como se trata de um processo *in situ*, e maiores concentrações de álcool favorecem a reação. Após a otimização dos parâmetros pressão e temperatura, essa variável será estudada. A Tabela 9 apresenta os níveis estudados e os resultados do planejamento de experimento em conversões de éster em peso de biomassa e de óleo.

A maior conversão em éster etílicos (32,22% em peso de biomassa) foi observada no ensaio 6, o qual utilizou maior pressão e tempo de reação, e menor temperatura, mostrando que a microalga adquirida comercialmente também tem potencial para a produção de biodiesel.

No gráfico de Pareto apresentado na Figura 8 observam-se os efeitos estimados das variáveis estudadas durante a reação de transesterificação. Verifica-se que a temperatura apresentou efeito significativo negativo enquanto as outras duas variáveis apresentaram

efeito significativo positivo a nível de 95% de confiança. E a interação das variáveis temperatura e tempo apresentou efeito significativo negativo para conversão em ésteres

**Tabela 9** - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> a conversão em ésteres a partir da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris*.

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Conversão em Ésteres %	
				Peso de biomassa	Peso de óleo
1	30 (-1)	50 (-1)	1 (-1)	12,64	30,41
2	30 (-1)	50 (-1)	8 (+1)	22,06	44,05
3	30 (-1)	80 (+1)	1 (-1)	0,00	0,00
4	30 (-1)	80 (+1)	8 (+1)	0,63	0,00
5	80 (+1)	50 (-1)	1 (-1)	15,81	37,38
6	80 (+1)	50 (-1)	8 (+1)	32,22	51,14
7	80 (+1)	80 (+1)	1 (-1)	4,11	6,77
8	80 (+1)	80 (+1)	8 (+1)	4,39	16,27
9	55 (0)	65 (0)	4,5 (0)	12,48	23,87
10	55 (0)	65 (0)	4,5 (0)	10,31	22,37
11	55 (0)	65 (0)	4,5 (0)	12,79	25,58

Fonte: O autor

A variável que apresentou maior efeito foi a temperatura, apresentando efeito significativo negativo, o que pode ser explicado pela faixa ótima de temperatura de atuação da enzima utilizada nas reações de transesterificação que é de 40°C à 60°C. As variáveis pressão e tempo apresentaram efeito significativo positivo, como a extração do óleo e a reação de transesterificação estão sendo realizadas em uma única etapa, maiores pressões podem ajudar no processo de extração do óleo favorecendo o aumento do rendimento no final da reação.

Com o tratamento estatísticos dos resultados foi possível à validação do modelo para conversão em éster de biomassa da microalga *Chlorella vulgaris*, em função de tempo, pressão e temperatura. O modelo codificado de 1<sup>a</sup> ordem para conversão em ésteres é apresentado na Equação 3, sendo que foi validado pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 10), onde coeficiente de determinação obtido foi de 0,99 e o F calculado 17 vezes maior que o F tabelado, permitindo assim a validação do modelo com 95% de confiança.

$$\text{Convers\~{a}o \u00e9ster} = 29,29 + 5,79P - 21,68T + 5,77t + 1,41PT + 1,51Pt - 2,80Tt \quad (3)$$

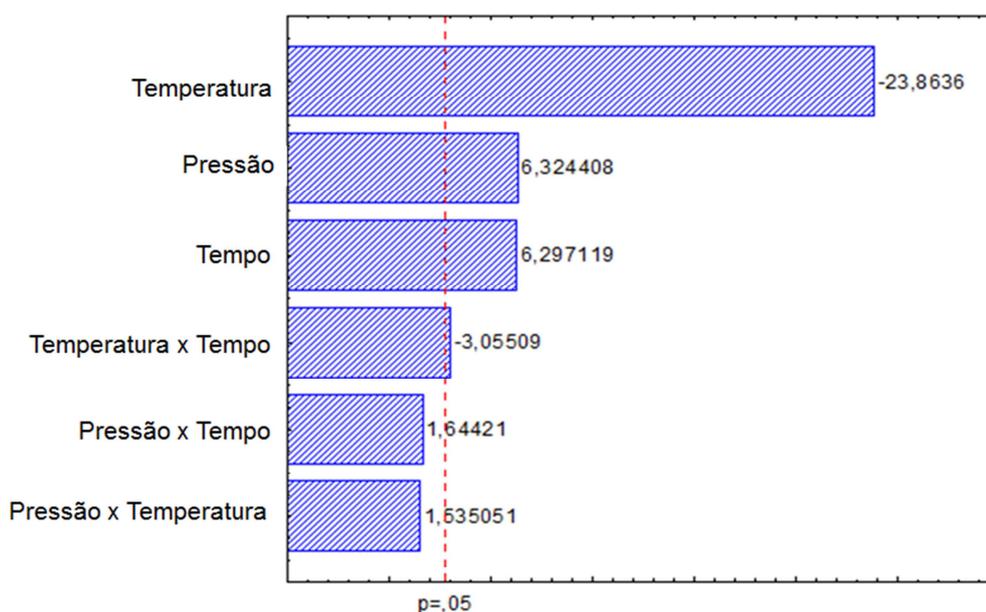
Onde:

P = press\u00e3o da rea\u00e7\u00e3o em bar.

T = temperatura da rea\u00e7\u00e3o em  $^{\circ}\text{C}$ .

t = tempo de rea\u00e7\u00e3o em horas.

**Figura 8** - Gr\u00e1fico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) para termos lineares e de intera\u00e7\u00e3o das vari\u00e1veis independentes para convers\u00e3o em \u00e9ster et\u00edlicos em termos de press\u00e3o, temperatura e tempo.



Fonte: O autor

**Tabela 10** - An\u00e1lise de vari\u00e2ncia para convers\u00e3o \u00e9ster et\u00edlicos com rela\u00e7\u00e3o as vari\u00e1veis tempo, temperatura e press\u00e3o.

Fatores	Soma Quadr\u00e1tica	Graus de Liberdade	M\u00e9dia Quadr\u00e1tica	F calculado
Regress\u00e3o	4454,72	6	742,45	110,59
Res\u00edduo	26,86	4	6,71	
Total	4481,57	10		

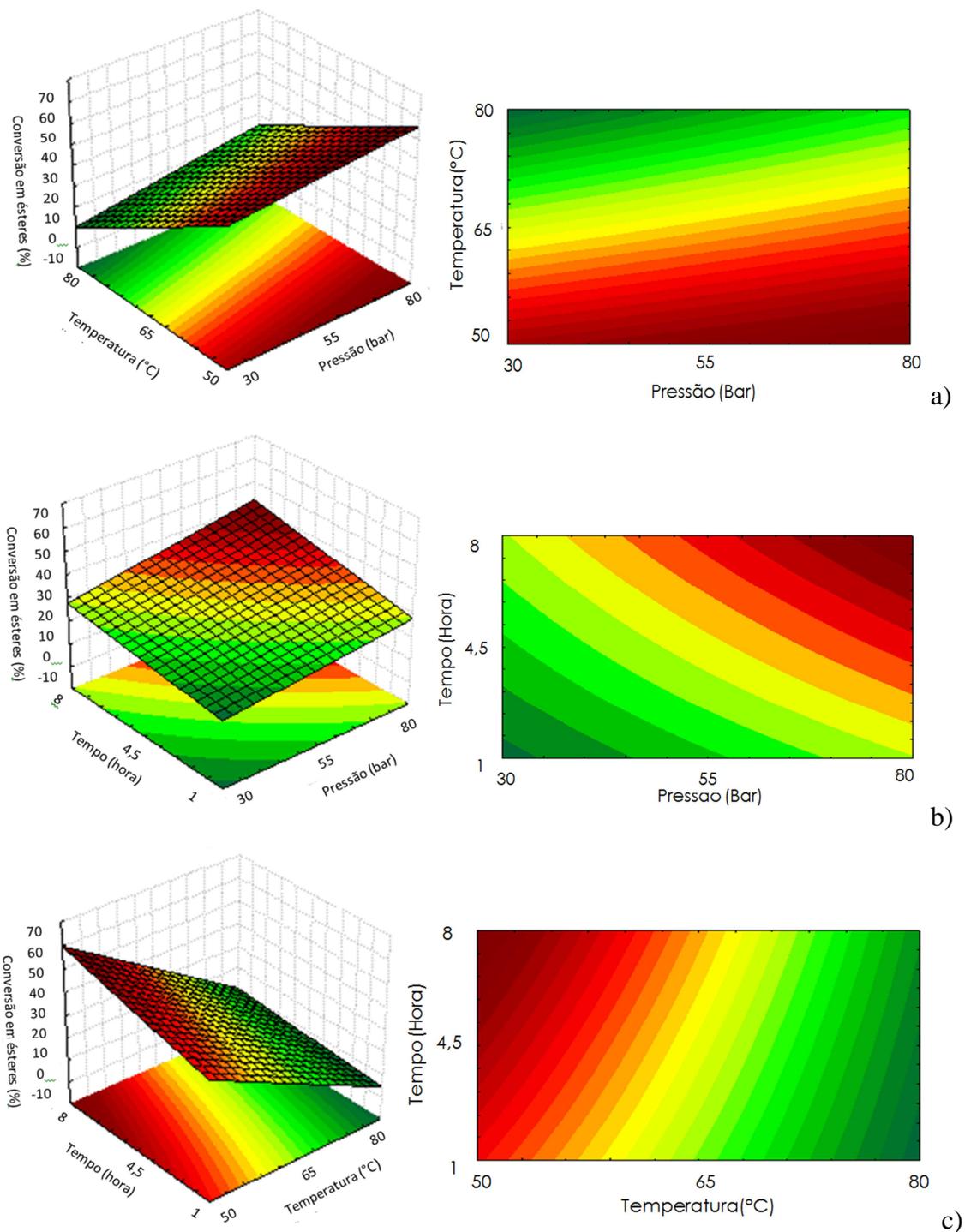
$R^2 = 0,99$        $F_{\text{tabelado } 0,95; 6; 4} = 6,16$

Fonte: O autor

Com o modelo validado foi possível construir as superfícies de resposta juntamente com as curvas de contorno que estão representadas na Figura 9. Onde pode se observar a interação dos parâmetros estudados com relação à conversão em éteres etílicos, os melhores rendimentos em éteres etílicos foram obtidos quando utilizadas temperaturas na faixa de 50°C, e pressão de 80 bar em maior tempo de reação (8 horas) demonstrando a otimização na produção de ésteres. A Figura 9-a representa a interação entre pressão e temperatura, quando se diminui a temperatura e eleva-se a pressão um maior rendimento em ésteres é observado. Na Figura 9-b mostra a interatividade dos parâmetros tempo e pressão onde é visualizada uma maior conversão quando os experimentos são submetidos a maiores pressões, por um maior tempo de reação. Na Figura 9-c é analisada a interação entre temperatura e tempo, onde com a diminuição da temperatura e aumento do tempo de reação o rendimento em ésteres etílicos é aumenta.

Para o processo de transesterificação direta as variáveis temperatura e pressão desempenham um papel dominante, uma vez que estão diretamente ligadas à reatividade dos reagentes. Os aumentos da temperatura e da pressão auxiliam a ultrapassar a barreira de energia de ativação, além de aumentar a solubilidade dos reagentes. O ponto supercrítico para um sistema onde tem extração e reação em uma única etapa é muitas vezes difícil de ser conhecido com exatidão, especialmente quando envolve mais de uma fase. Portanto, a temperatura e pressão ótimas para o processo utilizando diferentes matérias primas pode ser variável (LEE *et al.*, 2014). O ponto supercrítico do propano quando puro se encontra a uma temperatura de 96,7 °C e pressão de 42,5 atm segundo Smith *et al.* (2005), mas como o estudo se trata de uma mistura, não é possível saber especificamente qual é o ponto crítico do propano sem fazer um estudo do equilíbrio de fase.

**Figura 9** - Superfícies de resposta e curvas de contorno para conversão em ésteres das variáveis: (a) temperatura e pressão; (b) tempo e pressão; (c) temperatura e tempo.



Fonte: O autor

Na maioria das reações químicas catalisadas, as constantes velocidade de reação e transferência de massa, aumentam em maiores temperaturas, porém isso não acontece quando a reação é catalisada por enzimas. Quando submetidas a altas temperaturas pode ocorrer à desnaturação da proteína, assim o substrato não encaixa no sítio ativo da

enzima havendo um declínio na taxa de reação, e no rendimento de conversão (TAHER *et al.*, 2014b).

No estudo em questão o efeito significativo negativo na temperatura de reação foi vinculado a enzima (Novozym ® 435), por ter sua faixa ótima de atividade na temperatura de 40-60 C°, quando a reação foi submetida a temperaturas mais elevadas (80°C) o rendimento foi bem menor e quando associadas baixa pressão com alta temperatura (ensaios 3 e 4 Tabela 9) não apresentou rendimento em ésteres etílicos.

Quando a reação foi submetida a pressão de 80 bar e a temperaturas de 80°C foi observada uma pequena conversão 16% em peso de óleo. E segundo o estudo dos efeitos a pressão apresentou efeito significativo positivo. Na literatura encontra-se um estudo realizado por Taher *et al.* (2014 a) de extração de óleo de microalga com CO<sub>2</sub> onde o rendimento aumentou significativamente com o aumento da pressão conduzindo a rendimentos mais elevados mostrando assim que maiores pressões ajudam na extração do óleo o que pode facilitar a extração no processo de extração *in situ*.

A produção de biodiesel enzimático (Novozym ® 435) a partir de uma microalga (*Scenedesmus* sp.) utilizando fluidos pressurizados (CO<sub>2</sub>) foi relatado por Taher *et al.* (2014b), num processo integrado de extração e reação, eles variaram temperatura (35-55 °C), concentração enzimática (15-50%), razão molar metanol:óleo (3-15:1), tendo como rendimento ótimo de 80%, em bases de óleo, obtido depois de 4 horas de reação a 50 °C, 200 bar, concentração enzimática 35%, com uma razão molar de 9: 1 em um sistema descontínuo.

Taher *et al.*,(2015) utilizaram uma condição otimizada para a produção de ésteres metílicos, a reação foi realizada num tempo de 24 horas, como fluido pressurizado foi utilizado CO<sub>2</sub>, pres de 200 bar, temperatura de 50°C , com uma concentração enzimática de 30% e uma razão molar de metanol:óleo de 4:1 obtiveram uma conversão de 62% em ésteres metílicos.

Na tabela 9 pode se observar que no ensaio 6 em que a reação foi submetida a maior pressão (80 bar) e a menor temperatura (50°C) por um tempo de 8 horas, concentração enzimática de 20%, razão molar etanol:óleo 12:1 obteve-se uma conversão de mais de 50% em em ésteres etílicos durante um menor tempo de reação e menor concentração enzimática. Uma maior concentração de álcool foi necessária por

ser uma transesterificação *in situ*, onde se adiciona maiores concentrações de álcool para facilitar o processo de extração reação.

#### 4.2.1 Delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

De acordo com a observação dos resultados do planejamento 2<sup>3</sup>, visando aumentar a produção de ésteres etílicos, um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR), totalizando 11 experimentos, foi estudado. Como maiores pressões facilitam a extração do óleo, e no primeiro planejamento a pressão teve efeito significativo positivo, optou-se por aumentar a faixa de pressão variando de 59,5 a 200,5 bar. A temperatura utilizada no primeiro planejamento estava fora da faixa ótima de atuação enzimática, e apresentou um efeito significativo negativo então uma faixa menor de temperatura (46,9 a 68,1°C) foi utilizada nesse novo planejamento, ficando assim mais próximo da temperatura ótima da enzima que é de 40 a 60°C. O tempo foi fixado em 8 horas.

A Tabela 11 apresenta a matriz experimental em termos de conversão de ésteres etílicos a partir de biomassa de *Chlorella vulgaris*, para efeito de pressão e temperatura. De acordo com estes resultados a maior conversão em ésteres etílicos (74,39 %) foi obtida no ensaio 3, quando a reação foi realizada a uma temperatura de 50 °C, e submetida a uma pressão de 180 bar.

**Tabela 11-** Matriz do DCCR com a resposta em termos de conversão em ésteres etílicos

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Conversão em Ésteres (% Peso de biomassa)	Conversão em Ésteres (% Peso de óleo)
1	80 (-1)	50 (-1)	26,30	52,59
2	80 (-1)	65 (+1)	4,33	8,66
3	180 (+1)	50 (-1)	37,19	74,39
4	180 (+1)	65 (+1)	19,76	39,53
5	59,5 (-1,41)	57,5 (0)	15,87	31,74
6	200,5 (+1,41)	57,5 (0)	25,17	50,34
7	130 (0)	46,9 (-1,41)	28,67	57,35
8	130 (0)	68,1 (+1,41)	11,38	22,76
9	130 (0)	57,5 (0)	25,62	51,23
10	130 (0)	57,5 (0)	26,82	53,64
11	130 (0)	57,5 (0)	26,37	52,75

Fonte: O autor

Os resultados apresentados referentes à conversão em ésteres etílicos foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta. A análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes estão apresentados na Tabela 12. Os termos significativos no modelo codificado foram selecionados pelo valor de p, considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12** - Análise dos efeitos para termos lineares e quadráticos e de interação das variáveis independentes para a conversão em ésteres etílicos.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	52,53	3,84	<0,0005
Pressão Linear(P)	19,78	4,71	0,0085
Pressão Quadrática (P <sup>2</sup> )	-9,88	5,62	0,1388
Temperatura Linear (T)	-31,98	4,71	0,0011
Temperatura Quadrática (T <sup>2</sup> )	-10,88	5,62	0,1106
Pressão x Temperatura (PxT)	4,54	6,65	0,5253

Fonte: autor

A Tabela 13 apresenta a análise da variância (ANOVA) empregada para a validação do modelo matemático codificado usado para a predição da conversão de ésteres etílicos, dentro das faixas de pressão e temperatura estudados. O valor de F reflete a razão entre a soma quadrática média devido à regressão e a soma quadrática média devido ao erro e indica a significância do modelo.

O modelo codificado otimizado para a conversão em ésteres etílicos, apresentado na Equação 4, foi validado pela análise de variância (ANOVA). O coeficiente de determinação obtido (0,96) e o F calculado (12,76) maior que o F tabelado permitiram validar o modelo, com 95% de confiança. O modelo codificado foi utilizado para gerar a superfície de resposta (Figura 10-a) e a curva de contorno (Figura 10-b) para a conversão em ésteres etílicos em função da pressão e da temperatura. Observa-se que a faixa de temperatura na qual a conversão foi maior variou entre 46,9 à 57,5 °C e a faixa de pressão variou entre 130 à 200,5 bar.

$$EEAG = 52,53 + 19,78 \cdot P - 9,88 \cdot P^2 - 31,98 \cdot T - 10,88 \cdot T^2 + 4,54 \cdot P \cdot T \quad (4)$$

Onde:

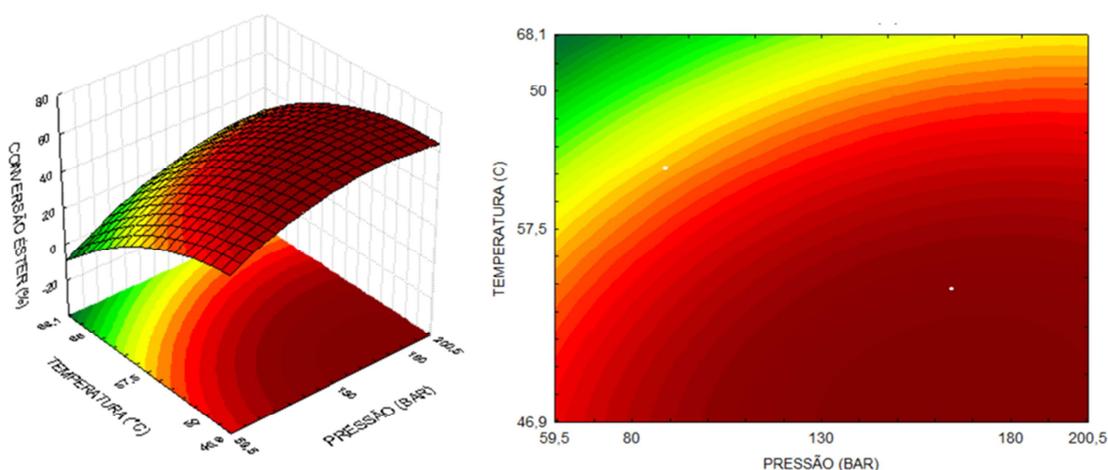
P = pressão da reação em bar.

T = temperatura da reação em °C.

**Tabela 13** - ANOVA para conversão em éster etílicos como respostas para o DCCR.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	2819,98	5	564,00	12,76
Resíduo	221,04	5	44,21	
Total	3041,02	10		

Coeficiente de correlação  $R^2 = 0,96$        $F_{0,95;5;5} = 5,05$

**Figura 10** - a) Superfície de resposta; b) Curva de contorno para conversão de EEAG.

Fonte: O autor

Assim, verificou-se que a utilização de maiores pressões podem aumentar o rendimento da reação quando realizadas a transesterificação *in situ*, pois ajudam no processo de extração e reação contribuindo para uma maior conversão de ésteres etílicos, enquanto que é necessário utilizar uma temperatura que esteja dentro da faixa ótima de atuação da enzima, pois se a enzima é inativada não ocorrerá o processo de transesterificação.

Dalla Rosa *et al.* (2008) ao produzir éster etílicos a partir de óleo de soja utilizando lipase Novozym 435 com propano como solvente, verificou que a pressão não exerceu influência significativa na conversão de ésteres etílicos, pois uma pequena diferença foi observada nas conversões realizadas (50 bar-88% e 150 bar-67,4%), sendo maior nas pressões menores quando expostas a uma temperatura de 65°C, no mesmo

tempo de reação (8 h) utilizado no presente trabalho. Porém no estudo de Dalla Rosa *et al.* (2008), não foi realizada transesterificação *in situ*, havendo uma operação a mais durante o processo, primeiro foi realizada a extração do óleo para depois ser feita a reação de transesterificação, sendo o tempo de oito horas apenas para a reação de conversão em ésteres.

Como os experimentos foram realizados por transesterificação *in situ*, e a extração ocorre durante o processo, maiores pressões facilitam a extração do óleo. Em trabalhos da literatura este comportamento também foi observado, Taher *et al.* (2014a), realizou um estudo para otimização da extração de lipídeos de *Scenedesmus* sp. (que será utilizado para a produção de biodiesel posteriormente), como solvente de extração foi utilizado CO<sub>2</sub>, obtiveram a melhor condição de extração, quando submeteram a biomassa a uma temperatura de 53 °C e pressão de 500 bar.

No primeiro planejamento a reação de maior conversão (51% em peso de óleo) ocorreu quando a reação foi submetida às seguintes condições, pressão de 80 bar, temperatura de 50°C, por 8 horas de reação, no segundo planejamento obteve-se a melhor conversão (74% em peso de óleo) quando a reação foi submetida a uma pressão de 180 bar, temperatura de 50°C, por 8 horas de exposição. Comprovando o efeito significativo positivo da variável pressão, pois ocorreu um incremento de 25% na conversão de ésteres etílicos quando utilizada a mesma temperatura e uma pressão maior.

Para as próximas reações de transesterificação *in situ* foi utilizada as condições do ensaio 3 descrito na Tabela 11 (pressão 180 bar e temperatura 50°C).

#### **4.2.2 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos**

A extração de lipídeos é um processo de transferência de massa onde deve ser levada em consideração a natureza do soluto e a polaridade do solvente, para uma melhor extração (RAJAN *et al.*, 2010). Nenhum dos métodos de extração pode qualificar ou separar a proporção de cada fração lipídica presente no óleo para isto é necessário a utilização da cromatografia em camada fina (GRIMA *et al.*, 2003). Dessa forma os ácidos graxos obtidos do delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR) de avaliação dos efeitos da pressão de 80 à 200,5 bar e a temperatura de 50 à 68,1 °C foram avaliados.

A Tabela 14 apresenta o perfil dos ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*. Verifica-se que houve diferença, na porcentagem da determinação de ácidos graxos quando foi variada a pressão e temperatura, o ensaio 3 (tabela 9) utilizou a mesma temperatura (50 °C) e pressão (180 bar) que o ensaio onde se obteve a maior conversão em éster etílicos no planejamento do item 2.3 (tabelaX), e encontrado como perfil de ácidos graxos: palmítico (C16:0) 22,9%; esteárico (C18:0) 11,7%; palmitoleico (C16:1) 12,2; cis heptadecanoico (C17:1) 9,9%; oleico (C18:1) 16,5%; linoleico (C18:2) 8,8%; linolênico (18:3) 10,7%; outros 7,3%. Lam e Lee (2013) realizaram uma extração do óleo de microalga *Chlorella vulgaris*, usando uma mistura de metanol e clorofórmio (razão molar 2:1), e encontraram como perfil de ácidos graxos: palmítico (C16:0) 25%; esteárico (C18:0) 5%; oleico (C18:1) 16%; linoleico (C18:2) 44,6%; linolênico (18:3); outros 3,1%.

Sharma *et al.* (2016), analisou a composição de ácidos graxos do biodiesel de *Chlorella vulgaris* e teve como resultado 33,53% de ácido graxo saturado, 28,68% de monoinsaturado e 37,12% de poli-insaturado. Eles afirmaram que quanto maior o teor de ácidos graxos saturados, a estirpe se torna mais adequada para a produção de biodiesel. Para o ensaio 3 (Tabela 9) que foi o mesmo que obteve a maior conversão em ésteres etílico, na análise do perfil de ácidos graxos para o óleo, foi encontrado um teor de 41,09% de ácidos graxos saturados, assim o óleo da microalga *Chlorella vulgaris* é adequado para a produção de biodiesel.

Os ácidos graxos mais comuns encontrados em biodiesel são ácido palmítico, esteárico, oleico e linolênico (KNOTHE, 2008). Segundo Ríos *et al.* (2013), óleos com alto valor de ácido oleico ajudam no equilíbrio das propriedades do combustível. Em todos os experimentos do presente trabalho foi detectada a presença de ácido oleico acima de 10%. Taher *et al.*, (2015) realizaram extração de microalga *Nannochloropsis* sp utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, a uma pressão de 300 bar e uma temperatura de 50 °C, e obtiveram uma composição de lipídeos que consistia principalmente em ácido oleico (34,5%) e palmítico (31,6%) e conseguiram uma conversão de 62% em ésteres metílicos a partir do óleo extraído.

**Tabela 14** - Determinação de Ácidos Graxos em *Chlorella vulgaris* obtidos a partir da extração do óleo.

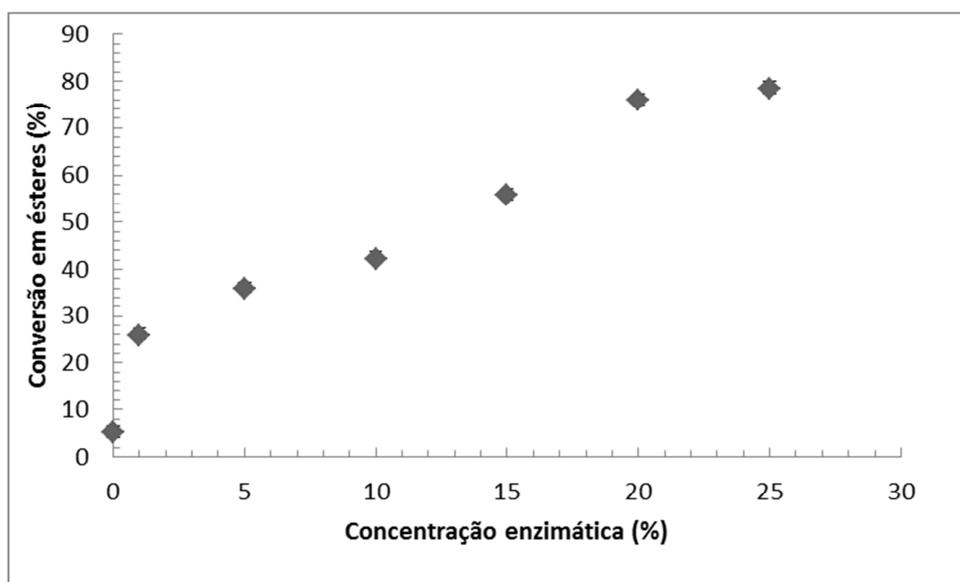
ÁCIDOS GRAXOS	EXPERIMENTOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	P-80 bar T-50 °C	P-80 bar T-65 °C	P-180 bar T-50 °C	P-180 bar T-65 °C	P-59,5 bar T-57,5 °C	P-200 bar T-57,5 °C	P-130 bar T-46,9 °C	P-130 bar T-68,1 °C	P-130 bar T-57,5 °C	P-130 bar T-57,5 °C	P-130 bar T-57,5 °C
<b>Saturados</b>											
C 14:0 mirístico		1,7	1,61			1,72	1,09	0,00		0	0,00
C 16:0 palmítico	22,13	22,35	22,89	20,22	25,20	25,16	18,99	17,50	37,33	37,34	33,97
C 17:0 heptadecanoico		1,87	2,06			1,70	1,46				
C 18:esteárico	5,67	13,07	11,65	15,22	7,86	12,04	8,45	10,56	16,19	13,59	15,76
C20:0 araquidônico		2,18	3,7			1,55	0,78	0,00			
C 22:0 behênico				2,39		2,03	1,99	1,57			
Total	27,8	41,17	41,906	37,83	33,06	44,19	32,77	29,63	53,52	50,93	49,73
<b>Monoinsaturado</b>											
C 14:1 meristoléico							0,80				
C 16:1 palmitoléico	11,16	9,65	12,21	5,24	13,94	7,23	11,40		9,30	7,61	7,67
C 17:1 cis heptadecanoico	12,81	5,85	9,91		7,35	4,56	12,13				
C 18:1 oléico	20,63	18,73	16,51	32,43	24,52	18,23	13,64	23,18	20,45	23,98	24,96
Total	44,6	34,23	38,63	37,68	45,81	30,01	37,97	23,18	29,75	31,59	32,63
<b>Poliinsaturado</b>											
C 18:2 linoléico	10,86	8,2	8,77	9,12	10,04	16,87	10,85	12,01	8,22	8,61	9,89
C 18:3 linolênico	16,71	16,36	10,67	15,37	11,09	7,13	18,33	35,18	8,39	8,87	9,23
Total	27,57	24,56	19,44	24,49	21,14	24,00	29,17	47,19	16,61	17,48	19,11

Fonte: O autor

### 4.3 Concentração de enzima

Os experimentos para o estudo da concentração enzimática foram realizados na condição de temperatura e pressão que conduziu ao melhor resultado de conversão avaliada na etapa anterior (50°C e 180 bar). As concentrações de enzimas estudadas foram de 0, 1, 5, 10, 15, 20 e 25% (p/p) e manteve-se o tempo de 8 horas de reação. Para este estudo a razão molar óleo:etanol foi fixada em 1:12, a mesma utilizada nos dois planejamentos. A Figura 11 apresenta os resultados de conversão em ésteres em função da concentração de enzima em relação ao substrato óleo etanol.

**Figura 11** - Transesterificação de biomassa de microalga com diferentes concentrações enzimáticas



Fonte: O autor

Através da Figura 11 pode-se constatar que para a reação acontecer há necessidade de adição de um catalisador, pois há uma diferença expressiva quando há presença de enzima e não. No experimento sem adição de enzima (0%) obteve-se apenas 5,01% de conversão, corroborando com Kildiran *et al.* (1996) e Qian *et al.* (2008) os quais afirmam que a transesterificação *in situ* é inativa sem catalisador. Para o experimento com apenas 1% de enzima obteve-se uma conversão de 25,93%. Por outro

lado a maior concentração enzimática (25%) apresentou a maior conversão em éster etílicos, de 78,44% de biomassa de microalga (Figura 11).

Menores custos no processo são desejados, desta forma como o custo da enzima é elevado e a diferença entre as concentrações enzimáticas 20% (75,83%) e 25% (78,44%) não foi expressiva para conversão em ésteres etílicos, se optou por utilizar concentrações de 20% de enzima nos demais experimentos.

Resultados de concentração enzimática foram similares aos encontrados na literatura. Jo *et al.* (2014) otimizaram a quantidade de Novozym 435 para síntese de ésteres etílicos, variaram a quantidade de enzima de 2-50% com base na biomassa de microalga (*Chlorella* sp. KR-1) as reações foram avaliadas nos tempos de 3 e 12 h em uma temperatura de 50°C, e definiram que 20% de enzima foi suficiente para catalisar a reação e concentrações maiores não afeta significativamente a conversão de ésteres metílicos. A concentração enzimática também foi estudada por Dalla Rosa *et al.* (2008) e Brusamarello *et al.* (2010) na transesterificação de óleo de soja utilizando propano e Novozym 435, também encontraram como melhor resultado a concentração de 20% de enzima.

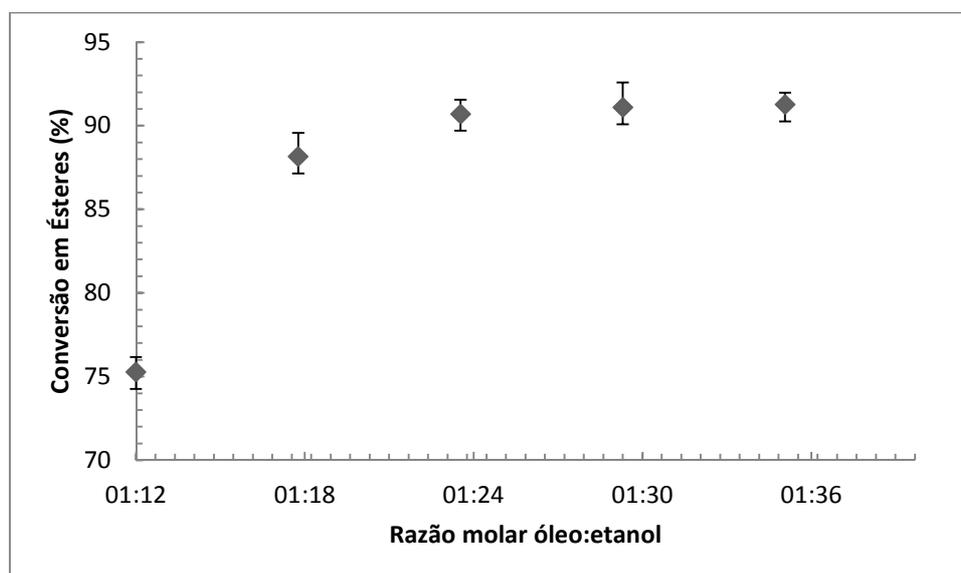
A conversão obtida nesse trabalho de 78,49% foi superior a encontrada por Taher *et al.* (2015) que utilizaram CO<sub>2</sub> supercrítico, na transesterificação enzimática do óleo de microalga *Nannochloropsis* sp, utilizando uma concentração de 30% de Novozym 435, uma razão molar de óleo:metanol de 4:1, 200 bar de pressão e 50°C de temperatura produzindo 62% de esteres metílicos. Maiores conversões podem ter sido obtidas porque o etanol tem menor efeito de inibição sobre a enzima do que o metanol o que favorece a conversão em ésteres etílicos. Uma boa conversão foi observada, mostrando que é possível realizar transesterificação com bons rendimentos de ésteres etílicos reduzindo a etapa de extração do óleo do processo.

#### 4.4 Avaliação da razão molar óleo:etanol

O metanol tem sido tradicionalmente o álcool mais utilizado na produção de biodiesel, por ser mais barato que o etanol, mas é menos solúvel em óleo. O etanol é mais seguro, e renovável e apresenta maior solubilidade em óleo (ZHANG *et al.*, 2014). Como o etanol apresenta boa solubilidade em óleo foi utilizado como substrato para reações de transesterificação.

A avaliação da razão molar óleo:etanol foi realizada adotando-se os seguintes valores para esta variável 1:12, 1:18, 1:24, 1:30, 1:36, mantendo fixas as variáveis: pressão de 180 bar, temperatura de 50°C, e a concentração enzimática de 20% (p/p) por um tempo 8 horas. A Figura 12 apresenta os resultados de conversão em ésteres para o estudo de diferentes razões molares óleo:etanol.

**Figura 12** - Transesterificação de biomassa de microalga com diferentes razões molar álcool : etanol.



Fonte: O autor

Os resultados obtidos nesta etapa sugerem que a razão molar óleo:etanol afeta positivamente o processo. Sendo que a maior diferença é vista em relação ao experimento com razão molar óleo:etanol 1:12 (75,25%) para 1:18 (88,15%) onde teve

um aumento de 13% na conversão em ésteres. Enquanto que os experimentos 1:18 para 1:24 o aumento foi em torno de 3%, com conversão de (90,62) em ésteres etílicos e os demais 1:30 (91,09) e 1:36 (91,26) foi de aproximadamente  $\pm 1\%$  na diferença das conversões. Assim optou-se por usar razão molar óleo:etanol 1:24 nos demais experimentos.

Brusamarelo *et al.* (2010) estudou o efeito da razão molar óleo:etanol para a transesterificação enzimática (Novozym 435) de óleo de soja utilizando propano, as reações foram feitas a uma temperatura de 65 °C e pressão de 50 bar, com 20% de enzima. Eles encontraram a maior conversão (92%) quando a razão molar foi de 1:6 (óleo:etanol), e observaram que razões molares superiores causavam inibição pelo etanol. Dalla Rosa *et al.* (2008) realizou um estudo nas mesmas condições, mas com concentração enzimática diferente (5%) e as razões molares de 1:3 a 1:9 afetaram positivamente o processo e razões molares superiores também apresentaram inibição por excesso de álcool.

Não ocorreu inibição por excesso de álcool nos experimentos apresentado na Figura 12, porque se trata de um processo de transesterificação *in situ* onde o maior teor de álcool é necessário para realizar a extração e a conversão ao mesmo tempo. De acordo com Lam e Lee (2013) transesterificação dos lipídeos bruto de microalgas (sem extrair o óleo), é necessária uma quantidade extremamente elevada de metanol, para concluir a conversão de lipídeos para ésteres metílicos. Isto ocorre por causa da elevada viscosidade dos lipídeos brutos das microalgas (três vezes mais viscoso do que o óleo vegetal) que indiretamente dificulta a solubilidade entre lipídeo e o metanol. Já para a transesterificação de óleos refinados apenas uma razão molar óleo: álcool 1:2, normalmente é suficiente para um alto grau de transesterificação (HASS e WAGNER, 2011).

Ao estudar a produção de biodiesel por *Clhorella vulgaris* utilizando ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como catalisador, Lam e Lee (2013) observaram que para uma razão molar baixa óleo:metanol (1:15) converteu apenas 15% EMAG com 6 horas de reação, para um aumento na conversão foi necessário um aumento na razão molar (1:180) atingindo valores de conversão de EMAG de 95%. Na Figura 12 pode-se observar uma boa conversão (75% esteres etílicos) ao utilizar uma baixa razão molar óleo:etanol

(1:12), ao realizar o experimento com razão molar 1:24 foi atingido valores de conversão acima de 90%, chegando a 6 vezes o valor encontrado por Lam e Lee (2013), utilizando etanol e realizando a transesterificação *in situ* foi possível utilizar uma menor quantidade de álcool e obter uma boa conversão.

#### ***4.5 Cinética de Produção de Biodiesel Enzimático de Biomassa de Chlorella vulgaris***

Este estudo teve como objetivo determinar o melhor tempo de reação, para isso realizou-se uma cinética de produção de biodiesel utilizando as melhores condições encontradas nos experimentos anteriores e os tempos de exposição foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 horas, onde foi avaliado o rendimento de ésteres etílicos produzidos durante o processo. As variáveis utilizadas foram pressão de 180 bar, temperatura de 50°C, concentração enzimática de 20% e razão molar óleo:etanol 1:24. Os resultados da cinética estão demonstrados na Figura 14.

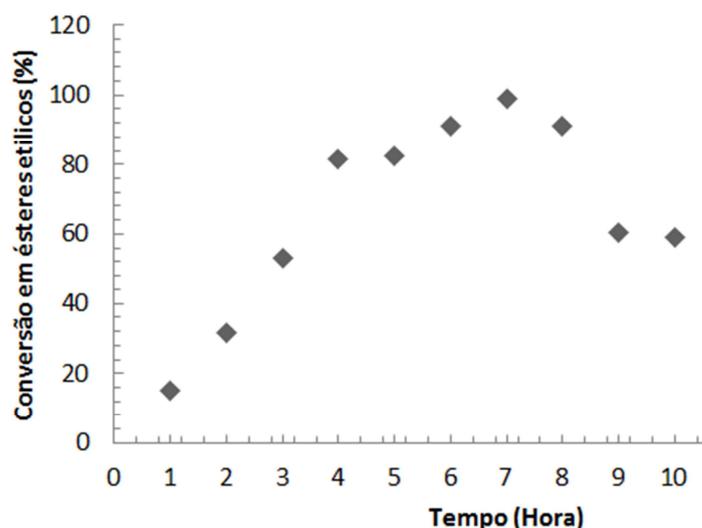
Na Figura 13 pode-se visualizar um incremento na conversão conforme o aumento do tempo até 7 horas de exposição, sendo que o maior incremento ocorreu até 4 horas (81,37%) em torno de 20% a mais do que em 3 horas de reação. Em 7 horas obteve-se uma conversão de 98,98% em ésteres etílicos e após 8 horas ocorreu uma diminuição na conversão. Como a conversão em 7 horas foi de 98,98% foi determinado como o melhor tempo de reação para a produção de biodiesel a partir de biomassa de microalga.

Poucos estudos foram encontrados na literatura até o presente momento para transesterificação catalisada por lipase utilizando microalga. Li *et al.* (2007) fizeram a transesterificação do óleo da microalga *Chlorella protothecoides*, produzida sobre condições favoráveis para maior produção lipídeos, obtiveram uma conversão de 98%, após 12h de reação usando uma concentração enzimática de 75% (*Candidíase* sp. 99-125) com uma razão molar óleo: metanol 1:3. Foi preciso 5 horas a mais para obter a mesma conversão que em 7 horas de reação utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* conforme apresentado na Figura 13.

Na transesterificação *in situ* de *Chlorella vulgaris*, Salam *et al.* (2016), observaram maiores rendimentos conforme aumentavam a razão molar óleo:metanol, a maior conversão foi obtida em apenas 20 min de reação a 60 °C, com NaOH como

catalisador com conversão de 83,24% quando submetida a uma razão molar óleo:metanol de 1:1276, para razão molar menores um tempo maior foi preciso para conseguir máximo rendimento.

**Figura 13-** Cinética de produção de biodiesel enzimático de biomassa de *Chlorella vulgaris*.



Fonte: O autor

Em concentrações maiores de álcool pode ser possível a diminuição do tempo de reação dos experimentos em estudo, porém o tempo necessário para a reação de etanólise é mais longo do que o tempo necessário para que ocorra a metanólise. De acordo com Marjanovic *et al.* (2010), são necessárias maiores proporções molares de álcool/óleo para aumentar a conversão de éster em tempos de reação mais curtos. Um tempo maior também é necessário, pois a reação está sendo catalisada por enzimas, que levam um maior tempo do que em reações com catalises alcalinas, mas como ponto positivo do uso de enzimas e a facilidade da remoção do catalisador ao final do processo, sendo mais fácil a purificação do biodiesel.

#### **4.6 Reutilização da enzima Novozym 435 na produção de biodiesel enzimático de biomassa de microalga.**

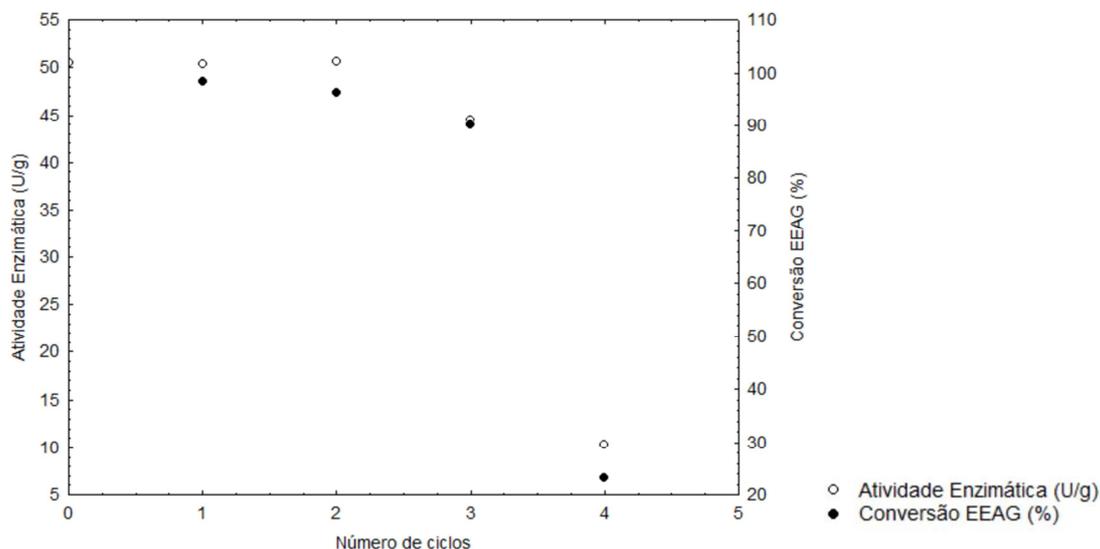
A grande vantagem da utilização de enzimas imobilizadas em reações de síntese é à possibilidade de reutilização das mesmas. Tendo como base este argumento, foram avaliados os ciclos de reutilização da enzima *Novozym 435* na condição otimizada nas etapas anteriores da produção de ésteres etílicos.

Devido ao custo elevado da enzima, a reutilização da mesma é um fator essencial para a produção de biodiesel em nível industrial. Os estudos de reutilização do catalisador foram realizados para investigar a estabilidade da enzima sob a pressão e temperatura utilizadas durante o processo após sucessivos ciclos de uso. A Figura 15 apresenta os resultados experimentais de conversão de ésteres etílicos e a respectiva atividade enzimática residual após cada ciclo.

Analisando os resultados da Figura 14, percebe-se que a atividade enzimática se manteve nos dois primeiros ciclos, onde a atividade inicial foi de 50,45 U/g, no primeiro ciclo 50,39 U/g e no segundo 50,59 U/g. No terceiro ciclo, ocorreu uma queda na atividade (44,39 U/G) e o quarto ciclo a enzima apresentou atividade inferior a 10 U/g, ocorrendo um diminuição na atividade de mais de 50% quando comparado ao ciclo anterior. O reuso do biocatalisador enzimático foi realizado para a condição otimizada, isto é, sem adição de água, e de acordo com Rahman *et al.*, (2012), a lipase em meio não aquoso muitas vezes sofre redução de atividade, seletividade e de estabilidade.

Para o rendimento em ésteres etílicos, observou o mesmo comportamento da atividade em enzimática de acordo com o número de ciclos. Nos dois primeiros ciclos os rendimentos foram 98,29 e 96,13%, respectivamente, já no terceiro ciclo ocorreu uma pequena diminuição na atividade residual obtendo uma conversão de 90,22 e com 23,21% de ésteres etílicos o quarto ciclo não apresentou uma boa conversão. Com base nestes dados há possibilidade de reutilização da enzima por 3 ciclos, com conversões em ésteres etílicos acima de 90%.

**Figura 14** - Atividade de esterificação da Novozym 435 após cada ciclo de uso para produção de biodiesel enzimático de biomassa de microalga.



Santin (2013) também observou para a transesterificação do óleo de soja utilizando ultrassom e Novozym 435, que conforme a atividade de esterificação diminui, também observa-se uma queda na conversão em ésteres etílicos. No primeiro reuso obteve 46,10 U/g de atividade e 73,68% de ésteres etílicos. Já no segundo reuso obteve uma atividade de 29,5 U/g e 9,27% em ésteres etílicos. No terceiro e quarto ciclos obteve conversões em ésteres etílicos de 6,22% e 3,65%, respectivamente.

Yu *et al.*, (2010) realizaram um estudo de reuso da enzima Novozym 435 para produção de biodiesel em sistema de ultrassom. As condições utilizadas foram, álcool terc-amílico (4 mL), óleo de soja (4 mmol), 50% de potencia do ultrassom, Novozym 435 (6% baseado no peso do óleo), 0,5% de água, 40°C de temperatura e 50 rpm durante 2 horas. Os autores concluíram que a enzima não foi desativada ou desnaturada quando submetida a potencia ultrassônica, perdendo um pouco de atividade (cerca de 4%) apos cinco ciclos de uso.

Foi observada uma boa estabilidade da enzima nos 3 primeiros ciclos e a conversão em ésteres etílicos foi satisfatória nos mesmos (Figura 14) mostrando que é possível fazer reaproveitamento da enzima por 3 ciclos de reações com propano pressurizado (180 bar, 50°C por 7 horas de reação) utilizando biomassa de microlaga *Chlorella vulgaris*.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que as variáveis temperatura e pressão apresentaram efeito no processo de transesterificação *in situ* com catalise enzimática de éster etílicos a partir de microalga *Chlorella vulgaris* utilizando propano pressurizado como solvente. De forma geral pôde se verificar que as estratégias utilizadas para a transesterificação direta apresentou uma grande potencialidade na produção de éster etílicos

As melhores condições de cada variável (temperatura 50°C, pressão 180 bar, 20% de enzima, razão molar óleo:etanol 1:24 por um tempo de reação de 7 horas) a reação de transesterificação *in situ* converteu 98,98% em ésteres etílicos de biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* com propano pressurizado como solvente e a reação catalisada por uma enzima imobilizada.

A reutilização da enzima mostrou-se interessante para o campo da catálise enzimática, evidenciando o comportamento complexo das lipases. A enzima *Novozym 435* manteve atividade durante 2 ciclos, perdendo mais de 50% da sua atividade só no quarto ciclo.

## 5.2 *Sugestões para trabalhos futuros*

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões podem ser definidas:

- O emprego de outro solvente e /ou misturas de solventes pressurizados na condução da transesterificação *in situ* utilizando biomassa de microalga;
- Produção de biodiesel utilizando transesterificação *in situ* em modo contínuo a partir de microalgas;
- Estudo da viabilidade econômica da transesterificação *in situ*;
- Estudo da produção de ésteres etílicos a partir de biomassa de outras microalgas ;
- Utilização de outras lipases incluindo enzimas não comerciais;
- Estudo da razão molar óleo:ácool utilizando metanol;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOMOHR A.E-F., JIM W., TU R., HAN S-F., EID M., ELADEL H. **Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016 v.64, 596-606.

ACOSTA G.M., SMITH JR R.L., WALSH J.E., BONI K.A. **Beef shank fat solubility in supercritical carbon dioxide–propane mixtures and in liquid propane.** Journal of Food Science. 1995, v.60, 983–987.

AHMAD A.L., MAT YASIN N.H., DEREK C.J.C., LIM J.K. **Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2011, v.15, 584–593.

ALMEIDA FILHO, C. **Estudo experimental e teórico de coeficientes de difusão binários envolvendo componentes de óleos essenciais em dióxido de carbono supercrítico.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil. 2003.

ALMEIDA J.R.M., FÁVARO L.C.L., QUIRINO B.F. **Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste.** Biotechnology for Biofuels. 2012, 5:48.

ANGARITA E.E.Y., ROCHA M.H., LORA E.E.S., VENTURINI O.J., TORRE E.A., ALVES C.T., RESTREPO S.Y.G. **Biocombustíveis de primeira geração: biodiesel.** In. LORA E.E.S., VENTURINI O.J. **Biocombustíveis.** 2012, v.1, 173-310.

ANP: **Agência Nacional de Petróleo.** [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acessado em fevereiro de 2015.

ANTUNES R., SILVA I.C. **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis.** Cluster do Conhecimento de Energia Renováveis, (INPI). 2010.

AVINASH A., SUBRAMANIAM D., MURUGESAN A. **BIO-DIESEL - A global scenario.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2014, v.29, 517-527.

BALAT M. **Prospects for worldwide biodiesel market development.** Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy. 2009, v.4 48-58.

BALAT M., BALAT H. **Progress in biodiesel processing.** Applied Energy. 2010, v.87, 1815-1835.

BARCLAY W.R. Mixtures of omega-3 and omega-6 highly unsaturated fatty acids from euryhaline microorganisms. US Patent 6977167; 2005.

BARNWAL B.K., SHARMA M.P. **Prospect of biodiesel production from vegetable oils in India.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2005, v.9, 363-378.

BARSANTI L., GUALTIERI P. **Algae: anatomy, biochemistry and bioengineering.** Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group. 2006, 1-34.

BONDIOLI P. **The Preparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions.** Topics in Catalysis. 2004, v.27, 77-82.

BOSS E. A. **Análise do desempenho de plantas de extração de óleo convencionais e de processos supercríticos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – FEQ – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

BOURNAY L., CASANAVE D., DELEFORT B., HILLION G., CHODORGE J.A. **New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants.** Catalysis Today, 2005, v.106, 190-192.

BOZBAS K. **Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2008, v.12, 542-552.

BRASIL. Lei nº 11.097, 13 de janeiro de 2005, que *Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira.* Medida provisória (MPV) nº 647, de 28 de maio de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF.

BRAVI M., BUBBICO MANNA R., VERDONE F.N. **Process optimisation in sunflower oil extraction by supercritical CO<sub>2</sub>**. Chemical Engineering Science. 2002, v.57, 2753-2764.

BRENNAN L, WENDE P.O. **Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, v.14, 557-577.

BRUNNER G. **Gas extraction, in: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Applications to Separation Processes**. Springer, Berlin, 1994.

BRUSAMARELO C.Z., ROSSET E., CÉSARO A., TREICHEL H., OLIVEIRA D., MAZUTTI, M.A., DI LUCCIO M., OLIVEIRA J.V. **Kinetics of lipase-catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane**. Journal of Biotechnology. 2010, v.147, 108-115.

CAMARGOS R.R.S. **Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel da transesterificação de óleo de grãos de café defeituoso**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Escola de engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CANAKCI M., SANLI H. **biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties**. Journal of Industrial Microbiology and biotechnology. 2008, v.35, 431-441.

CASTRO H. F., ANDERSON W. A. **Fine chemicals by biotransformation using lipase**. Química Nova. 1995, v. 18, 544-554.

CHAPMAN A.R.O. **Chlorophyta**. In LASKIN A.I, LECHEVALIER, H.A. **Handbook of Microbiology: Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses**. Clevelanland: CRC Press,INC. 1977, v.2, 381-399.

CHAVANNE G. **Procédé de transformation d'huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants.** Patente Belga n° 422.877 (31 agosto de 1937). Chem. Abst. 32:4313 (1938).

CHAVANNE G. **Sur un mode d'utilisation possible de d'huile de palme à la fabrication d'un carburante lourd.** Bulletin de la Société Chimique. 1944, v. 10, 52-58. **Chemical Abstracts.** 1994, v.38, 2183.

CHEMSEDDINE B. AUDINOS, R. **Anion-exchange membrane reactor for esterification of oleic acid and methanol: REMI.** Catalysis Today. 1995, v. 25, 417-422.

CHEN C-Y., YEH K-L., AISYAH R., LEE D-J., CHANG J-C.; **Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review.** Bioresource Technology. 2011, v.102, 71-81.

CHEN P., MIN M., CHEN Y., WANG L., LI Y., CHEN Q. **Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach.** *International Journal of Agricultural and Biological Engineering.* 2009, v.2, 1-28.

CHISTI Y. **Biodiesel from microalgae.** Biotechnology Advance. 2007, v.25, 294-306.

CHRISTOPHER L.P., KUMAR, H., ZAMBARE V.P. **Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities.** Applied Energy. 2014, v.119, 497-520.

COM (2006) 34 final. **An EU strategy for biofuels.** Commission of the European Communities, Brussels, 8.2.2006.

CONVERTI A., CASAZZA A.A., ORTIZ E.Y., PEREGO P., DEL BORGHI M. **Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloris oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.** Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 2009, v.48, 1146-1151.

DALLA ROSA C. **Produção de éster etílicos a partir de óleo de soja utilizando lipase em propano.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai, Erechim, RS, 2006.

DALLA ROSA C., MORANDIM M.B., NINOW J.L., DARIVA C., OLIVEIRA D., TREICHEL H., OLIVEIRA J.V. **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane.** The Journal of Supercritical Fluids. 2008, v.47, 64-69.

DALLA ROSA C., MORANDIM M.B., NINOW J.L., OLIVEIRA D., TREICHEL H., OLIVEIRA J.V. **Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids.** Bioresource Technology. 2009, v.100, 5818-5826.

DALLA ROSA C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, 2009.

DANQUAH M.K., GLADMAN B., MOHEIMANI N., FORDE G.M. **Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency.** Chemical Engennier Journal. 2009, v.151, 73-78.

DARNOKO D., CHERYAN M. **Kinetics of palm oil: Trasesterification in a Batch Reactor.** JAOCS. 2000, v. 77, 1263-1266.

DASARI M.A., GOFF M.J., SUPPES G.J. **Non, catalytic Alcoholysis Kinetics of Soybean Oil.** Journal American Oil Chemists Society. 2003, v.80 189-192.

DEMIRBAS A. **Biodiesel for future transportation energy needs.** Energy Sources, PartA: Recovery, Utilization and Environmental Effects. 2010, v.32, 1490-1508.

DEMIRBAS A. **Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey.** Energy Conversion and Management. 2003, v. 44, 2093-2109.

DEMIRBAS A. **Biodiesel production from vegetable oil via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods.** Progress in Energy and Combustion Science. 2005, v.31, 466-487.

DIESEL E. **Diesel – Der Mensch – Das Werk – das Schicksal.** Hanseatische Verlagsgesellschaft. Hamburg, 1937.

DONG M., WALKER T.H. **Characterization of high-pressure carbon dioxide explosion to enhance oil extraction from canola.** The Journal of Supercritical Fluids. 2008, v.44,193-200.

EHIMEN EA, SUN ZF, CARRINGTON CG. **Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids.** Fuel. 2010, v.89, 677-84.

ESQUIVEL M. M., BERNARDO-GIL M. G., KING M. B. **Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil.** Journal of Supercritical Fluids.1999, v.16, 43-58.

FACCIO C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

FALCÃO P.W.C. **Produção de biodiesel em meio supercrítico** Tese de Doutorado Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011.

FAO Fishery Information, Data and Statistics Unit (FIDI). c2002. Fishery Statistical 2006 Collections. FIGIS DataCollection.FAO, Rome. <http://www.fao.org>.

FREITAS L.S., OLIVEIRA J.V., DARIVA C., JACQUES R.A., CARAMÃO E.B. **Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008, v.56, 2558-2564.

FUKUDA H., KONDO A., NODA H. **Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils.** Journal of Bioscience and Bioengineering. 2001, v.92(5), 405-416.

GOUVEIA L., OLIVEIRA A.C. **Microalgae as a raw material for biofuels production.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2009, v.36, 269-274.

GRIMA M.E., BELARBI E.H., FERNANDEZ F.G.A., MEDINA A.R., CHISTI Y. **Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics.** Biotechnology Advances. 2003, v.20, 491-515.

GUI M.M., LEE K.T., BHATIA S.; **Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock.** Energy. 2008, v.33, 1646-1653.

HAAS M.J., WAGNER K.. **Simplifying biodiesel production: the direct or *in situ* transesterification of algal biomass.** European Journal of Lipid Science and Technology. 2011, v.113, 1219-1229.

HAMDAN S., DAOOD H.G., TOTH-MARKUS M., ILLÉS V. **Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane.** Journal Supercritical Fluids. 2008, v.44, 25-30.

HARTMAN L., AND LAGO R.C.A. International Organization for Standardization (ISO 5509). Laboratory Practice 1973, 22, 475.

HASSAN M.N., RAHMAN N.N.A.B., IBRAHIM M.H., MOHD OMAR A.K. **Simple fractionation through the supercritical carbon dioxide extraction of palm kernel oil.** Separation and Purification Technology. 2000, v.19, 113-120.

HE H., WANG T., ZHU S. **Continuons production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process.** Fuel. 2007, v.86, 442-447.

HEGEL P.E., ZABALOY M.S., MABE G.D.B., PEREDA S., BRIGNOLE E.A. **Phase equilibrium engineering of the extraction of oils from seeds using carbon dioxide + propane solvent mixtures.** Journal of Supercritical Fluids. 2007, v.42, 318-324.

HIDALGO P., CIUDAD G., SCHOBER S., MITTELBACH M., NAVIA R. **Biodiesel synthesis by direct transesterification of microalga *Botryococcus braunii* with continuous methanol reflux.** Bioresource Technology. 2015, v.181, 32-39.

HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M. **Microalgaltriacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances.** The Plant Journal. 2008, v.54, 621–639.

ILLÉS V., DAOOD H. G., PERNECZKI S., SZOKONYA L., Then M. **Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super and subcritical conditions.** Journal of Supercritical Fluids. 2000, v.17, 177-186.

ILLÉS V., SZALAI O., THEN M., DAOOD H., PERNECZKI S. **Extraction of hiprose fruit by supercritical CO<sub>2</sub> and propane.** Journal of Supercritical Fluids. 1997, v.10, 209-218.

JANAUN J., ELLIS N. **Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel.** Renewable & Sustainable Energy Reviews. 2010, v.14, 1312–1320.

JEONG G.T., PARK J.H., PARK S.H., PARK D.H. **Estimating and improving cold filter plugging points by blending biodiesels with different fatty acid contents.** Biotechnol. Bioprocess Engenier. 2008, v.13 505-510.

JEONG G. T, PARK D. H. **Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert – Butanol.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 2007, v. 148, 131-9.

JO Y.Y., LEE O.K., LEE E.Y **Dimethyl carbonate-mediated lipid extraction and lipase-catalyzed *in situ* transesterification for simultaneous preparation of fatty acid methyl esters and glycerol carbonate from *Chlorella* sp. KR-1 biomass.** Bioresource Technology. 2014, v.158, 105-110.

JOHNSON MB, WEN Z. **Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass.** Energy Fuels. 2009, v.23, 5179-5183.

KAJAN M., MANSO L., TICHY. V., PERZ-BORROTTO E., FISER LIVANSKY K. **Use of pCO<sub>2</sub> electrode for dosing glucose in mixed culture of autotrophic microorganisms.** In Algal biotechnology in the Asia-Pacific Region. Ed. Phang, S.M. Kuala Lumpur, Universitu of Malaya. 1994, 155-160.

KANEL J.S., GUELCHER S.A. **Method for rupturing microalgae cells.**US Patent 6000551; 1999.

KANSEDO J., LEE K.T., BHATIA S. **Cerberaodollam (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production.** Fuel. 2009, v.88, 1148-1150.

KILDIRAN G., YUCEL S., TUNKAY S. **“In situ Alcoholysis of Soybean Oil”.** Journal of the American Oil Chemists’ Society. 1996, v.73(2), 225 – 228.

KNEZ Z., HABULIN M., KRMELJ V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases.** Journal of Supercritical Fluids. 1998, v.14, 17-29.

KNEZ Z., MARKOCIC E., LEITGEB M., PRIMOZIC M., KNEZ HRNCIC M., SKERGET M. **Industrial applications of supercritical fluids: A review.** Energy. 2014, v.77, 235-243.

KNOTHE G. A história dos combustíveis derivados de óleos vegetais. In. \_\_\_\_\_, GERPEN J.V., KRAHL J., RAMOS L.P. **Manual De Biodiesel.** 2006. 3ª edição. 5-19.

KNOTHE G. GERPEN J.V., KRAHL J. **The biodiesel handbook.** American oil Chemist’s Societu Press. Illinois: EUA. 2005, 588.

KNOTHE G. **Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels.** Inform 2001, v.12, 1103-1107.

KNOTHE G. **“Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties.** Energy Fuels. 2008, v.22, 1358-1364.

KNOTHE G. **Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition.** Energy Environ. Sci. 2009, v. 2, 759-766.

KUSDIANA D., SAKA S. **Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol.** Fuel Processing Technology. 2001, v.80, 225-231.

LAM M.K., LEE K.T. **Catalytic transesterification of high viscosity crude microalgae lipid to biodiesel: Effect of co-solvent.** Fuel Processing Technology. 2013, v.110, 242-248.

LANZA M., PRIAMO W.L., OLIVEIRA J.V., DARIVA C., OLIVEIRA D. **the effect of temperature, pressure, exposure time and depressurization rate on lipase activity in SCCO<sub>2</sub>.** Applied biochemistry and biotechnology. 2005, v.181, 113-116.

LARDON L., HELIAS A., SIALVE B., STEYER J., BERNARD O. **Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae.** Environmental Science & Technology, 2009, v.43, 6475-6481.

LEE K.T., LIM S. PANG Y.L., ONG H.C., CHONG W.T. **Integration of reactive extraction with supercritical fluids for process intensification of biodiesel production: Prospects and recent advances.** Progress in Energy and Combustion Science. 2014, v.45, 54-78.

LEUNG D. Y. C., WU X., LEUNG M. K. H. **A review on biodiesel production using catalyzed transesterification.** Applied Energy. 2010, v. 87, 1083-1095.

LI X., XU H., WU Q. **Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors.** Biotechnology and Bioengineering. 2007, v.98, 764-771.

LI Y., HORSMAN M., WU N., LAN C.Q., DUBOIS-CALERO N. **Biofuels from microalgae.** Biotechnology Progress, 2008, v.24(4), 815-820.

LIU J., LIN R., NAN Y., TAVLARIDES L.L. **Production of biodiesel from microalgae oil (*Chlorella protothecoides*) by non-catalytic transesterification: Evaluation of reaction kinetic models and phase behavior.** The Journal of Supercritical Fluids. 2015, v.99, 38-50.

LORA E.E.S., PALACIO J.C.E., ROCHA M.H., VENTURINI O.J., BROCEL.M. Futro dos biocombustíveis: biorefinarias e biocombustíveis a partir de algas e células microbianas. In. LORA E.E.S., VENTURINI O.J. **Biocombustíveis**. 2012, v.2, 1034-1148.

LOTERO E., GOODWIN J.G., BRUCE D.A., SUWANNAKARN K., LIU Y., LOPEZ D.E. **The catalysis of biodiesel synthesis**. Catalysis. 2006, v.11, 1300-1311.

LUO, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. **A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification**. Applied Microbiol Biotechnol. 2006, v.73, 349-355.

MA F, HANNA M.A. **Biodiesel production: a review**. Bioresour Technology. 1999, v.70, 1-15.

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M, PARKER J. **Microbiologia de Brok**. 10ª Edição. São Paulo. Prentice Hall INC. 2004, 608.

MADRAS G., KOLLURU C., KUMAR R. **Synthesis of Biodiesel in supercritical fluids**. Fuel. 2004, v.83, 2029-2033.

MARCILLA A., CATALÁ L., GARCÍA-QUESADA J.C., VALDÉS F.J., HERNÁNDEZ M.R.A **Review of thermo chemical conversion of microalgae**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2013, v.27, 11-19.

MARJANOVIC A.V., STAMENKOVIC O.S., TODOROVIC Z.B., LAZIC L.M., VELJKOVIC V.B. **Kinetics of the base-catalyzed sunflower oil ethanolysis**. Fuel. 2010, v.89, 665-671.

MARRONE C., POLLETO M., REVERCHON E., STASSI. **Almond oil extraction by supercritical CO2: experiments and modelling**. Chemical Engineering Science. 1998, v. 53, 3711-3718.

MATA T.M., MARTINS A.A., CAETANO N.S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, v.14, 217-232.

MCGINNIS K.M., DEMPSTER T.A., SOMMERFELD M.R. **Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetocerus muelleri*.** Journal of Applied Physiology. 1997, v.9 19-24.

McHUGH M., KRUKONIS V. **Supercritical Fluid Extration.** Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.

Metcalfe, L. D.; Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. (1966). *Anal. Chem.*, 38 (3) 514-515.

MEHER L.C., SAGAR D.V., NAIK S.N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a reiew.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2006, v.10, 248-268.

MENDES M.F., PESSOA F.L.P., QUEIROZ E.M., MELO S.A.B.V., NELSON D.L. **Distillation and Drying in Handbook of Food Products Manufacturing.** John Wiley & Sons Publication, USA. 2007, 157-168.

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

MITTELBACH M., REMSCHMIDT C. **Biodiesel – A comprehensive handbook.** Karl-Franzens University, Graz, Austria. 2004.

MITTELBACH M., TRATHINIGG B. **kinetics of alkaline catalyzed methanolysis of sunflower oil.** Europa Journal Lipid Science Technologi. 1990, v.92, 145-148.

MUBARAK M., SHAIJA A., SUCHITHRA T.V. **A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production.** Algal Reserch. 2015, v.7, 117-123.

NDIAYE P.M., LANZA M., TAVARES F.W., DARIVA C., OLIVEIRA D., OLIVEIRA J.V. **Phase behavior of olive and soybean oils in compressed propane and n-butane.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, in press, 2006.

NAGLE N., LEMKE P. **Production of methyl ester fuels from microalgae.** Appl Biochem Biotechnol. 1990, v.24/25, 355-361.

NAN Y., LIU J., LIN R., TAVLARIDES L.L. **Production of biodiesel from microalgae oil (*Chlorella protothecoides*) by non-catalytic transesterification in supercritical methanol and ethanol: Process optimization.** The Journal of Supercritical Fluids. 2015, v.97, 174-182.

NASCIMENTO M. G., COSTA NETO P. R., MAZZUCO, L. M. **Biotransformação de óleos e gorduras: Utilização de lípases para obtenção de biocombustíveis.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 2004, v.33, 27-38.

NATRAH F., YOSO V.F.M., SHARI V.M., ABAS F., MARIANA N.S. **Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value.** Journal of Applied Phycology. 2007, v.19, 711-718.

OLIVEIRA D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, RJ, 1999.

OLIVEIRA D., OLIVEIRA J.V. **Enzymatic Alcoholysis of Palm Kernel Oil in n-hexane and in SCCO<sub>2</sub>.** The Journal of Supercritical Fluids. 2001, v.19, 141-148.

OLIVEIRA D., OLIVEIRA J.V. **Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>.** Industrial Engineering Chemistry Research. 2000, v. 39, 4450.

OLIVEIRA D., FEHRMANN A.C., RUBIRA A.F., KUNITA M.H., DARIVA C., OLIVEIRA, J.V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of supercritical fluids, in press. 2006, v.38, 373-382.

ONAY M., SONMEZ C., OKTEM H.O., YUCEL A.M. **Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: Isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia.** Bioresource Technology. 2014, v.169, 62-71.

ÔTLES S., PIRE R. **Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species.** Journal of AOAC International. 2001, v.84(6), 1708-1714.

PATIL V., TRAN K-Q., GISELROD H.R. **Towards sustainable production of biofuels from microalgae.** Journal Of Molecular Sciences. 2008, v.9, 1188-1195.

PEDERSSETTI M.M., PALÚ F., DA SILVA E.A., ROHLING J.H., CARDOZO FILHO L., DARIVA C. **Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propano and supercritical carbone dioxide.** Journal of Food Engineering. 2011, v.102, 189-196.

PEQUENO M.A.G. **Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa.** Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

PINZI S., GARCIA I.L., LOPEZ-GIMENEZ F.J., LUQUE DE CASTRO M.D., DORADO G., DORADO M.P. **The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications.** Energy Fuels. 2009, v.23(5), 25-41.

POISSON L., DEVOS M., PENCREAC'H G., ERGAN F. **Benefits and current developments of polyunsaturated fatty acids from microalgae lipids.** OCL – Oleagineux Corps Gras Lipides. 2002, v.9(2-3), 92–95.

PRATOOMYOT J., SRIVILAS P., NOIRAKSAR T. **Fatty acids composition of 10 microalgalspecies.** Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2005, v.27(6), 1179-1187.

PRAVEENKUMAR R., SHAMEERA K., MAHALAKSHMI G., AKBARSHA M.A., THAJUDDINN. **Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a**

**dominant indigenous microalga *Chlorella sp.*, BUM11008: Evaluation for biodiesel production.** *Biomass and Bioengineering*. 2012, 37, 60-66.

QIAN J., WANG F., LIU S., YUN Z. **“*In situ* Alkaline Transesterification Seed Meal”.** *Bioresource Technology*. 2008, v.99(18), 9009-9012.

RAHMAN M.B.A., JUMBRI K., HANAFIAH N.A.M.A., ABDULMALEK E., TEJO B.A., BASRI, M.; SALLEH A.B. **Enzymatic esterification of fatty acid esters by tetraethylammonium amino acid ionic liquids-coated *Candida rugosa* lipase.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012, v. 79, 61– 65.

RANJAN A., PATIL C., MOHOLKAR V.S. **Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2010, v.49, 2979-2985.

RASHID N., REHMAN M.S.U., SALIQ M., MAHMOOD T., HAN J. **Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014, v.40, 760-778.

RAVEN P.H., EVERT R.F., EICHHORN S.E. **Biologia vegetal.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 1992. 728.

RAVEN, P.H. *Biologia vegetal*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906.

RENAUD S.M., THINH L.V., PARRY D.L. **The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture.** *Aquaculture* 1999, v.170, 147-159.

Resenha Energética Brasileira exercício de 2015, edição 2016 (EPE – Empresa de Pesquisa Energética – Ministério de Minas e Energia).

REVERCHON E., MARCO I. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006, v.38, 146-166.

RICHMOND A. **Handbook of microalgal culture.** *Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd; 2004.

RÍOS S.D., CASTAÑEDA J., TORRAS C., FARRIOL X., SALVADÓ J. **lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two diferente paths: screening studies toward biodiesel production.** Bioresource Technology. 2013, v.133, 378-388.

RODOLFI L., ZITTELLI G.C., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N., BONINI G. **Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor.** Biotechnology and Bioengineering. 2009, v.102(1), 100-112.

SAFI C., ZEBIB B., MERAH O., PONTALIER P-Y., VACA-GARCIA C. **Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorellavulgaris*: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2014, v.35, 265-278.

SALAM K.A., VELASQUEZ-ORTA S.B., HARVEY A.P., **Kinects of fast álcali reactive extraction/*in situ* transesterification of *Chlorella vulgaris* that identifies process conditions for a significant enhanced rate and water tolerance.** Fuel Processing Technology. 2016, v.144, 212-219.

SANCHEZ A., MACEIRAS R., CANCEL A., RODRÍGUEZ M. **Influence of n-hexane on *in situ* transesterification of marine macroalgae.** Energies. 2012, v.5, 43-257.

SANTIN C. **Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** Tese de Doutorado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2013.

SHAH S., GUPTA M.N. **Lipase catalyzed preparation of biodiesel from jatropha oil in a solvent free system.** Process Biochemistry. 2007, v.42, 409-14.

SHAO P., MENG X., H.E.J., SUN P. **Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soap stock.** Food Bioproducts Processing. 2008, v. 86, 283-289.

SHARMA A.K., SAHOO P.K., SINGHAL S., JOSHI G. **Exploration os upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris***. 2016, v.216, 793-800.

SHEEHAN J., DUNAHAY T., BENEMANN J., ROESSLER P. **A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae**. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA; 1998.

SILVA C. **Produção Contínua de Biodiesel por Transesterificação não catalítica de Óleo de Soja**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, 2009.

SINGH S., GULDHE A., RAWAT I., BUX F. **Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2014, v.29, 216-245.

SMITH J.M., VAN NESS H.C., ABBOTT M.M. **Introduction Chemical Engineering Thermodynamics**. 7ª Edição, McGraw – Hill International Edition 2005.

SPOLAORE P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN E., ISAMBERT A. **Commercial applications of microalgae**. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006, v.101(2), 87-96.

SUAREZ P.A.Z., MENEGHETTI S.M., MENEGHETI P.M.R., WOLF C.R. **Transformação de Triglicerídeos em Combustíveis, Materiais Poliméricos e Insumos Químicos: Algumas Aplicações da Catálise na Oleoquímica**, Química Nova. 2007, v.30(3), 667-676.

TABATABAEIA M., TOHIDFARA M., JOUZANIA G.S., SAFARNEJADA M., PAZOUKIB M.; **Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2011, v.15, 1918-1927.

TAHER H., AL-ZUHAIR S., AL-MARZOUQI A., HAIK Y., FARID M. **Growth of microalgae using CO<sub>2</sub> enriched air for biodiesel production in supercritical CO<sub>2</sub>.** Renewable Energy. 2015, v.82, 61-70.

TAHER H., AL-ZUHAIRA S., AL-MARZOUQI A.H., HAIKB Y., FARIDC M. **Enzymatic biodiesel production of microalgae lipids under supercritical carbon dioxide: Process optimization and integration.** Biochemical Engineering Journal. 2014 (b), v.90, 103-113.

TAHER H., AL-ZUHAIRA S., AL-MARZOUQI A.H., HAIKB Y., FARIDC M., TARIQ S. **Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up.** The Journal of Supercritical Fluids. 2014 (a), v.86, 57-66.

TEO C.L., JAMALUDDIN H., ZAIN N.A.M., IDRIS A. **Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis sp.*** Renewable Energy. 2014, v.60, 1-5.

TOMASELLI L. The microalga Cell. In: RICHOND, A. **Handbook of Microalgal Culture.** Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004, 3-19.

TRAN N.H., BARTLETT J.R., KANNANGARA G.S.K., MILEV A.S., VOLK H., WILSON M.A. **Catalytic up grading of biorefinery oil from micro-algae.** Fuel. 2012, v.89, 265-274.

TRENTIN, C. M. **Estudo da cinética de transesterificação não-catalítica de óleo de soja com co-solvente em reator micro tubo.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2010.

VASCONCELOS, R. F. L. **Produção de biomassa *C. vulgaris* (Chordat) para extração de óleo.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre. Recife 2012.

WAHIDIN S., IDRIS A., SHALEH S.R.M. **Rapid biodiesel production using wet microalgae via microwave irradiation.** Energy Conversion and Management. 2014, v.84, 227-233.

WALNE, P.R. **Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostreaedulis*.** Fishery Investigations, 1966, v.25(4), 1-53.

WILLIAMS, D. F. **Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol.**J. Am. Oil Chem. Soc., U.S.A. 1981, v.36(11), 1769-1788.

WILSON K.E., HUNER N.P.A. **The role of growth rate, redox-state of the plastoquinome pool and the trans-thylakoid Delta pH in photo acclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature.** Planta. 2001, v. 212, 93-102.

XIN L, HONG-YING H, JIA Y. **Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly-isolated fresh water microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent.** New Biotechnology. 2010, v.27, 59-63.

YAMAMOTO M., FUJISHITA M., HIRATA A., KAWANO S. **Regeneration and maturation of daughter cell walls in the auto spore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).** Journal of Plant Reserch. 2004, v.117, 257-64.

YAMAMOTO M., KURIHARA I., KAWANO S. **Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).** Planta. 2005, v.221, 766-777.

YOKOCHI T, NAKAHARA T, HIGASHIHARA T, TANAKA S, YAGUCHI T. **Microorganisms capable of producing highly unsaturated fatty acids and process for producing highly unsaturated fatty acids by using the microorganisms.** US Patent 6582941; 2003.

YU D., TIAN L., WU H., WANG S., WANG Y., MA D., FANG X. **Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435**. Process Biochemistry. 2010, v.45, 519-525.

ZAPPI M, HERNANDEZ R, SPARKS D, HORNE J, BROUGH M, SWALM D.C. **A review of the engineering aspects of the biodiesel industry**. MSU E-TECH Laboratory Report ET-03-003; 2003.

ZHANG Y., LI Y., ZHANG X., TAN T. **Biodiesel production by direct transesterification of microalgal biomass with co-solvent**. Bioresource Technology. 2015, v.196, 712-715.

ZHENG H., YIN J., GAO Z., HUANG H., JI X., DOU C. **Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves**. Applied biochemistry and biotechnology. 2011, v.164, 1215-1224.

[http://botany.natur.cuni.cz/algoc/CAUP/H1955\\_Chlorella\\_vulgaris.htm](http://botany.natur.cuni.cz/algoc/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm), acessado em 28/10/2016 às 14:36.