

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* DA
MICROALGA *Scenedesmus sp.* VISANDO À SÍNTESE DE
ÉSTERES PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

KEMELY BRUNA Z. F. BRANCO

Maringá, maio de 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* DA
MICROALGA *Scenedesmus sp.* VISANDO À SÍNTESE DE
ÉSTERES PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Kemely Bruna Z. F. Branco

Engenheiro de Alimentos, UEM, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá como
parte integrante do requisito para
obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química, área de
Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR - Brasil

Maio de 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B816e Branco, Kemely Bruna Zandonadi Ferriani
Estudo da transesterificação *in situ* da microalga
Scenedesmus sp. visando à síntese de ésteres para
produção de biodiesel / Kemely Bruna Zandonadi
Ferriani Branco. -- Maringá, 2013.
76 f. : il., color figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2013.

1. Biodiesel - Produção - Microalga. 2.
Microalga - Transesterificação *in situ*. I. Arroyo,
Pedro Augusto, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. III. Título.

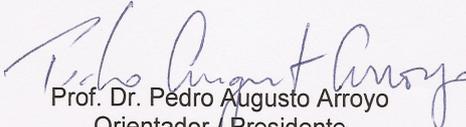
Cdd 21.ed. 665.3

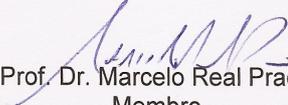
ECSL-001585

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por
Kemely Bruna Zandonadi Ferriani Branco perante a Comissão Julgadora do
Curso de Mestrado em Engenharia Química em 29 de maio de 2013.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo
Orientador / Presidente


Prof. Dr. Marcelo Real Prado
Membro


Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira
Membro

A Deus toda honra e glória por ter me sustentado e permitido que chegasse até aqui.

A Ele toda minha gratidão.

À minha família, em especial, ao meu marido, Marcos Paulo, por todo o amor, incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me capacitado a realizar este trabalho e ter me sustentado diante de todas as adversidades encontradas. A Ele minha eterna gratidão por me amar e estar no controle de todas as coisas.

Ao Professor Pedro Augusto Arroyo pela confiança, orientação, amizade e oportunidade de realizar este trabalho e todo conhecimento a mim transmitido.

Ao meu marido, Marcos Paulo, por todo apoio, amor e incentivo em todos os momentos e pelo seu cuidado nos momentos de dificuldades. Te amo.

Aos meus familiares e amigos que estiveram sempre torcendo e orando por mim.

Aos amigos do Laboratório de Catálise Heterogênea (LCHBio) pela amizade, companhia, ajuda e auxílio nesta pesquisa. Amigos que conquistei durante esta caminhada e que sempre me incentivaram, em especial, Elias Trevisan, Caroline Cioneck, Samira Mendes, Rodrigo Raia.

À aluna de iniciação científica, Natália Vendramini, por colaborar significativamente no desenvolvimento da parte experimental.

Ao departamento de Engenharia Química da UEM que me ofereceu toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do DEQ pelos diversos auxílios e informações, em especial ao Valmir e a Luiza.

À Capes pelo suporte financeiro.

*“Em tudo daí graças, porque esta é a vontade de Deus.”
1 Tess 5:18a*

**ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* DA MICROALGA
Scenedesmus sp. VISANDO À SÍNTESE DE ÉSTERES PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

Autora: Kemely Bruna Z. F. Branco

Orientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo (DEQ/UEM)

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco E-46, Sala 09; CEP 87020-900 – Maringá-PR-Brasil, defendida em 29 de maio de 2013.

RESUMO

Pesquisas em busca por fontes alternativas e/ou complementares para produção de energia estão amplamente relacionadas com a produção de biocombustíveis, mais especificamente o biodiesel. O mesmo é comumente reconhecido como uma alternativa verde ao diesel de petróleo e oriundo de fontes renováveis. Dentre as fontes renováveis para a produção de biodiesel destacam-se as microalgas, principalmente, devido ao seu alto teor de lipídios e sua alta produtividade. Desta forma, o objetivo desta dissertação foi estudar a síntese de ésteres metílicos e etílicos via transesterificação *in situ* a partir da microalga *Scenedesmus sp.* visando à produção de biodiesel. Para tanto, avaliou-se a influência dos parâmetros solvente, tempo, temperatura e agitação no rendimento em ésteres. A partir dos resultados obtidos, observou-se que a caracterização do óleo da microalga foi de extrema importância na determinação do catalisador a ser utilizado na reação, além de determinar a composição em ácidos graxos, característica esta, ligada à qualidade final do biodiesel. Observou-se, também, que os melhores rendimentos em ésteres foram obtidos a 60 °C, independente do álcool utilizado na transesterificação *in situ*. Além disso, verificou-se que a agitação levou a uma pequena redução no tempo de reação sem levar a aumentos significativos no rendimento em ésteres. Dentre todas as reações realizadas a combinação de parâmetros que levou aos maiores rendimentos em ésteres foi a utilização de etanol, n-hexano a 60 °C, durante 90 minutos, sem agitação, com um valor de 84,84 mg ésteres/g biomassa seca. Os resultados obtidos indicaram que o etanol se mostrou mais eficiente na produção de ésteres, levando a rendimentos superiores em diferentes condições de reação. Este resultado é de extrema importância,

pois além de levar a maiores rendimentos em ésteres utiliza um reagente de origem renovável, além é claro, de seu menor custo quando comparado ao metanol devido a sua disponibilidade no Brasil. Os elevados valores de rendimento em ésteres observados indicaram que a transesterificação *in situ* apresentou-se com grande potencial de utilização, além de levar a redução de custos com tempo de reação e uso de solventes, quando a mesma é comparada ao processo clássico de transesterificação do óleo.

Palavras-chave: Biodiesel; Microalga; Transesterificação *in situ*.

**STUDY OF *IN SITU* TRANSESTERIFICATION OF *SCENEDESMUS sp.*
MICROALGAE AIMING FOR A SYNTHESIS OF ESTERS FOR BIODIESEL
PRODUCTION**

Author: Kemely Bruna Z. F. Branco

Supervisor: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo (DEQ/UEM)

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Colombo Av., 5790, E-46-09; ZIP 87020-900 – Maringá-PR-Brazil, presented in May, 29th 2013.

ABSTRACT

Research for alternative and/or complementary source for energy production are largely related to the production of biofuels, specifically biodiesel. The same is commonly recognized as a green alternative to petroleum diesel and come from renewable sources. Among the renewable sources for producing biofuels microalgae stand out, mainly, due to its high lipid content and its high productivity. Thus, the aim of this thesis was to study the synthesis of methyl and ethyl esters via *in situ* transesterification from the microalgae *Scenedesmus sp.* aiming at the production of biodiesel. Therefore, evaluated the influence of solvent, time, temperature and agitation parameters on yield esters. From the results, it was observed that the characterization of oil from microalgae is of extreme importance in determining the catalyst to be used in the reaction and to determine the fatty acid profile, a characteristic related to the final quality of biodiesel. It was also observed that the best results were obtained at 60 °C, regardless of alcohol used in the transesterification. Furthermore, verified that the agitation resulted in a small reduction in reaction time without leading to significant increases in yield esters. Among all the reactions carried out the combination of parameters that was more appropriate in this study was the use of ethanol, n-hexane at 60 °C, for 90 minutes, without agitation, with a value of 84.84 mg esters/ g dry weight. The results showed that ethanol is more efficient in producing esters, leading to higher yields at different reaction conditions. This result is extremely important, as well as lead to higher yields of esters using a reagent from renewable sources, and of course, its lower cost compared to methanol because of its availability in Brazil. The high yield values observed in

esters indicated that the *in situ* transesterification presented with great potential use, and lead to cost reduction with reaction time and solvent use, when it is compared to the classic process of transesterification oil.

Keyword: Biodiesel; Microalgae; *in situ* transesterification.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II.....	4
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1 Biodiesel	4
II.1.1 Cenário brasileiro	5
II.2 Matérias-primas	8
II.3 Microalgas	10
II.3.1 <i>Scenedesmus sp.</i>	12
II.3.2 Composição das microalgas	13
II.3.3 Outras aplicações	19
II.4 Produção de ésteres	20
II.4.1 Transesterificação <i>in situ</i>	20
II.4.1.1 Álcool	21
II.4.1.2 Catalisador	22
II.4.1.3 Temperatura	23
II.4.1.4 Razão molar álcool:óleo	24
II.4.1.5 Solvente	25
II.4.1.6 Agitação	27
II.4.1.7 Umidade	27
II.5 Conclusões da revisão bibliográfica	28
CAPÍTULO III	30
MATERIAIS E MÉTODOS	30
III.1 Produção da biomassa	30
III.2 Extração e purificação do óleo	31
III.3 Caracterização do óleo	32

III.3.1 Determinação do índice de acidez	33
III.3.2 Determinação da composição em ácidos graxos do óleo	34
III.4 Produção de ésteres.....	35
III.4.1 Transesterificação <i>in situ</i>	35
III.4.2 Identificação dos ésteres obtidos.....	36
III.4.3 Quantificação do ésteres.....	36
CAPÍTULO IV.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
IV.1 Extração e purificação do óleo	39
IV.2 Caracterização do óleo.....	43
IV.2.1 Índice de acidez	43
IV.2.2 Composição em ácidos graxos.....	43
IV.3 Transesterificação <i>in situ</i>	45
IV.3.1 Obtenção de ésteres metílicos.....	45
IV.3.2 Obtenção de ésteres etílicos	54
IV.3.3 Perfil de ésteres metílicos e etílicos produzidos nas reações <i>in situ</i>	65
CAPÍTULO V	68
CONCLUSÕES.....	68
CAPÍTULO VI.....	70
REFERÊNCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II. 1 - Evolução dos biocombustíveis no Brasil.....	6
Figura II. 2 - Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país.	7
Figura II. 3 - Colônia de <i>Scenedesmus sp.</i>	12
Figura II. 4 - Análise da composição lipídica das microalgas <i>Wild, D. tertiolecta</i> e <i>N. Oculata</i>	15
Figura II. 5 - Comparação entre a transesterificação convencional e a transesterificação <i>in situ</i>	21
Figura IV. 1 - Coluna recheada com carvão ativado utilizada na purificação do óleo de microalga.	40
Figura IV. 2 - Extrato diluído em n-hexano: a) antes; e b) após passar pela coluna recheada com carvão ativado.....	41
Figura IV. 3 – Espectroscopia no UV-vis: a) amostra após a extração (extrato); b) amostra purificada na coluna com carvão ativado; c) óleo de soja refinado.	42
Figura IV. 4 – Rendimento em ésteres metílicos obtido na reação <i>in situ</i> em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente n-hexano.....	46
Figura IV. 5 – Rendimento em ésteres metílicos obtido na reação <i>in situ</i> em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente clorofórmio.	46
Figura IV. 6 – Rendimento em ésteres metílicos em função do tempo, para diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente n-hexano.	50
Figura IV. 7 – Rendimento em ésteres metílicos em função do tempo em diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente clorofórmio.....	52
Figura IV. 8 – Rendimento em ésteres etílicos obtido na reação <i>in situ</i> , em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente n-hexano.....	54
Figura IV. 9 – Rendimento em ésteres etílicos obtido na reação <i>in situ</i> , em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente clorofórmio.	55
Figura IV. 10 – Rendimento em ésteres etílicos em função do tempo, em diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente n-hexano.	59
Figura IV. 11 – Rendimento em ésteres etílicos em função do tempo, em diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente clorofórmio.....	61
Figura IV. 12 – Composição em ácidos graxos do óleo de microalga e perfil de ésteres metílicos produzidos, utilizando o solvente n-hexano e clorofórmio.....	65

Figura IV. 13 – Composição em ácidos graxos do óleo de microalga e perfil de ésteres etílicos produzidos, utilizando o solvente n-hexano e clorofórmio.	66
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II. 1- Fontes de óleo para a produção de biodiesel.....	9
Tabela II. 2- Composição química de diferentes microalgas em % de biomassa seca.	13
Tabela II. 3 – Classificação dos lipídeos.....	14
Tabela II. 4 - Composição em ácidos graxos das microalgas <i>Scenedesmus sp.</i> e <i>Scenedesmus obliquus</i> .	17
Tabela II. 5 - Ésteres metílicos de ácidos graxos no biodiesel de microalga <i>Chlorella protothecoides</i> .	18
Tabela II. 6 - Propriedades do biodiesel de óleo de microalgas e do diesel de petróleo.	18
Tabela II. 7 - Produção e diferentes usos das microalgas.	19
Tabela II. 8 – Critérios para seleção de cosolventes.	26
Tabela III. 1 - Meio MC para cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i>	30
Tabela III. 2 - Composição da Solução A5.....	31
Tabela IV. 1 – Comprimento de onda das bandas principais observadas nos espectros no UV-vis.	43
Tabela IV. 2 – Composição em ácidos graxos do óleo purificado da microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	44
Tabela IV. 3 – Rendimento máximo em ésteres metílicos em diferentes temperaturas.	48
Tabela IV. 4 - Rendimento máximo em ésteres metílicos, das reações <i>in situ</i> realizadas utilizando o solvente n-hexano, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.	51
Tabela IV. 5 - Rendimento máximo em ésteres metílicos, nas reações <i>in situ</i> realizadas utilizando o solvente clorofórmio, com e sem agitação, em diferentes temperaturas. ...	53
Tabela IV. 6 – Rendimento máximo em ésteres etílicos em diferentes temperaturas...	57
Tabela IV. 7 – Rendimento máximo em ésteres etílicos, para as reações <i>in situ</i> realizadas utilizando o solvente n-hexano, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.....	60
Tabela IV. 8 – Rendimento máximo em ésteres etílicos, para as reações <i>in situ</i> realizadas utilizando o solvente clorofórmio, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.....	62
Tabela IV. 9 – Rendimento máximo em ésteres metílicos e etílicos.....	64

NOMENCLATURA

A_p	Área no cromatograma relativa ao padrão interno na amostra analisada
A_x	Área no cromatograma relativa ao ácido graxo x na amostra analisada
F	Fator de correção da solução de NaOH 0,01 mol/L
FCE	Fator de correção experimental ou empírico
$FCEA$	Fator de conversão
FCT	Fator de correção teórico
M	Molaridade da solução de hidróxido de sódio (mol/L)
M_A	Massa de lipídeos totais (g)
M_p	Massa do padrão interno (mg)
M_x	Massa do ácido graxo x na amostra analisada de lipídeos totais (mg/g)
P	Massa do biftalato de potássio usado na titulação (g)
P_o	Massa da amostra de óleo (g)
PI	Padrão interno
V	Volume da solução de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação (mL)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Há décadas combustíveis fósseis utilizados para produção de energia e transportes possuem um papel fundamental no desenvolvimento da vida humana e de novas tecnologias. No entanto, os mesmos são provenientes de fontes não renováveis e o seu uso contribui com a emissão de gases de efeito estufa e, conseqüentemente, para o aquecimento global (SINGH e GU, 2010).

Com o crescimento da população, o desenvolvimento industrial e a preocupação com o meio ambiente tornaram-se necessárias pesquisas em busca de fontes alternativas para produção de energia visando minimizar os impactos do aquecimento global. Vindo ao encontro deste interesse surgem os biocombustíveis, entre eles, o biodiesel.

Atualmente o Brasil é considerado o país pioneiro no uso de biocombustíveis, encontrando-se hoje em uma posição almejada por muitos países que buscam fontes de energia alternativas ou complementares aos combustíveis fósseis (ANP, 2012).

No entanto, para que seja possível suprir a demanda pelo biodiesel são necessárias pesquisas constantes em busca por novas matérias-primas e tecnologias para produção do mesmo. Neste sentido, tem se destacado os estudos de produção de microalgas como fonte de matéria-prima alternativa, com alto potencial.

As microalgas são a forma de vida mais antiga (BRENNAN e OWENDE, 2010), estando presentes em todo o ecossistema. Se estima que exista mais de cinquenta mil espécies, porém, apenas uma pequena quantidade é estudada (MATA et al., 2010).

As microalgas possuem inúmeras características que as tornam uma fonte promissora de energia. Dentre as principais características pode-se citar que as microalgas podem ser cultivadas fotossinteticamente usando a luz solar para a energia e CO₂ como fonte de carbono (SINGH e GU, 2010). As microalgas possuem um alto

potencial de crescimento e numerosas espécies com teor de lipídeos totais na faixa de 20 a 50% da biomassa seca. Também, a taxa de crescimento exponencial pode dobrar a biomassa em períodos tão pequenos como 3,5 h (CHISTI, 2007; SING e GU, 2010; AHMAD et al., 2011). Além disso, são capazes de se reproduzir o ano inteiro e a quantidade de óleo produzida excede o rendimento de qualquer oleaginosa (CHISTI, 2007).

Apesar de todas as vantagens que as microalgas possuem, ainda existem diversos degraus tecnológicos no seu uso para a produção de biodiesel. Problemas relacionados à seleção da espécie, condições de cultivo visando maximizar o teor de lipídeos, extração do óleo etc. Entre estes degraus a extração do óleo ganha destaque, pois esta é uma etapa que requer muito cuidado e pode causar perdas significativas no teor de lipídeos, na composição em ácidos graxos etc.

Como alternativa à etapa de extração de óleo da biomassa algácea, tem-se o processo de transesterificação *in situ* ou transesterificação direta. Os primeiros trabalhos utilizando a transesterificação *in situ*, segundo Ehimen et al. (2010), foram realizados por Harrigton e Darcy Evans em 1985. Os mesmos obtiveram um acréscimo de até 20% no rendimento em éster na transesterificação *in situ* de sementes de girassol, quando comparado ao processo convencional. Este aumento no rendimento foi atribuído pelos autores devido à melhora na acessibilidade do óleo da biomassa pelo meio ácido.

A transesterificação *in situ* consiste em eliminar a etapa de extração do óleo realizando a reação direta da biomassa seca da microalga, simplificando o processo de produção de biodiesel. Isto permite que a extração do óleo e a transesterificação ocorra em uma única etapa (LAM e LEE, 2011). Assim, pesquisadores estão recorrendo à transesterificação *in situ*, pois a mesma quando comparada à extração do óleo seguida da transesterificação tem demonstrado uma melhora significativa no rendimento em ésteres, além de eliminar as dificuldades encontradas no processo de extração do óleo das microalgas. (LAM e LEE, 2011; HALIM et al., 2012; VELASQUEZ-ORTA et al., 2012).

Neste contexto, os trabalhos disponíveis na literatura estudam a influência de diversos fatores na produção de ésteres, como tempo de reação, tipo de catalisador, agitação, umidade da biomassa, razão molar álcool: óleo, utilização de solventes, dentre outros.

Baumgärtner (2011) estudou a transesterificação *in situ* das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* utilizando a metodologia baseada no procedimento

proposto por Lewis et al. (2000) e obteve bons rendimentos em ésteres, indicando que a transesterificação *in situ* possui um grande potencial de produção de ésteres a partir da biomassa de microalga.

Portanto, objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ésteres via transesterificação *in situ* utilizando biomassa de microalga. Assim, foi escolhida a microalga *Scenedesmus sp.*, tendo em vista que esta microalga já foi utilizada em outros trabalhos do grupo e encontra-se disponível no Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel (LCHBio) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (DEQ/UEM).

Para atingir o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- a) extração e purificação do óleo extraído da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.*;
- b) caracterização do óleo purificado, determinação do índice de acidez e composição em ácidos graxos;
- c) realização da transesterificação *in situ*;
- d) avaliação do efeito do tipo de álcool (metanol e etanol) e do solvente (n-hexano e clorofórmio) sobre o rendimento em ésteres para a transesterificação *in situ* da microalga;
- e) avaliação dos parâmetros de reação tempo, temperatura e agitação no rendimento em ésteres para a transesterificação *in situ* da microalga.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Biodiesel

O biodiesel é comumente reconhecido como uma alternativa verde ao diesel de petróleo e oriundo de fontes renováveis. Tal composto, é considerado biodegradável e não tóxico. O mesmo é definido como um éster mono-alquila de ácidos graxos de cadeia longa derivado da reação de transesterificação de matérias-primas renováveis (LEUNG et al., 2010; AHMAD et al., 2011; AMARO et al., 2011; LAM e LEE, 2011).

O biodiesel possui inúmeras características que lhe tornam uma alternativa eficiente ou um complemento aos combustíveis fósseis, como cita Knothe et al. (2006):

- é totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades;
- é derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural;
- é biodegradável;
- gera redução na emissão dos gases de exaustão;
- possui alto ponto de fulgor, conferindo um manuseio e armazenamento mais seguro;
- possui excelente lubricidade.

Segundo estudos da associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos (*National Biodiesel Board*), quando se compara o biodiesel com o diesel de petróleo, a queima do biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono, 47% menos material particulado (que penetra nos pulmões) e 67% menos

hidrocarbonetos. Esses percentuais variam de acordo com a quantidade de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo (ANP, 2012).

No entanto, o biodiesel como todo produto possui suas desvantagens. Segundo Knothe et al. (2006), as que mais se destacam são:

- alto custo;
- aumento na emissão de NO_x nos gases de exaustão;
- baixa estabilidade quando exposto ao ar.

Para que as vantagens com uso do biodiesel prevaleçam, cada país produtor possui uma legislação específica que regulamenta a produção, o uso e determina a qualidade final do produto.

No Brasil as especificações são semelhantes à americana e européia, lembrando que o importante é que a mistura entre biodiesel e diesel atenda as especificações do diesel, principalmente, quanto às exigências do sistema de injeção, do motor, do sistema de filtragem e de exaustão (BIODIESEL NO BRASIL, 2008).

Além das vantagens no uso de biodiesel já citadas, no Brasil mais pontos positivos podem ser destacados, pois a produção do mesmo propicia o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável e traz, também, a perspectiva da redução das importações de óleo diesel, conseqüentemente, a diminuição da dependência do diesel importado (ANP, 2012).

O biodiesel também traz outros efeitos indiretos com sua produção e uso. O aumento da produção e consumo do biodiesel beneficia milhares de famílias brasileiras, proporcionando aumento de renda proveniente do cultivo e comercialização das plantas oleaginosas utilizadas na produção do biodiesel, além de gerar efeito positivo sobre o meio ambiente (ANP, 2012).

Devido a estas e outras vantagens, muitos investimentos foram e estão sendo feitos para o desenvolvimento dos biocombustíveis no país, colocando o Brasil como um dos maiores produtores e consumidores de biocombustíveis do mundo (ANP, 2012).

II.1.1 Cenário brasileiro

O Brasil é considerado o país pioneiro no uso de biocombustíveis e hoje está em uma posição almejada por muitos países que buscam fontes de energia alternativas ao petróleo. Segundo a ANP (2012), atualmente cerca 45% da energia e 18% dos combustíveis utilizados no Brasil são oriundos de fontes renováveis. Já no resto do

mundo, apenas 14% da energia são provenientes de fontes renováveis. Devido ao crescimento deste setor se fez necessário a inclusão dos biocombustíveis à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). A ANP é o órgão regulador das atividades que integram a indústria do petróleo, gás natural e biocombustíveis no Brasil, sendo que a mesma está vinculada ao Ministério de Minas e Energia e, também, é responsável pela execução da política nacional para o setor energético (ANP, 2013).

A ANP define biocombustíveis como combustível oriundo de biomassa renovável que podem substituir parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural para geração de energia (ANP, 2012).

Historicamente o biocombustível surgiu no país com o álcool e a sua expansão começou em 1973, com o primeiro choque do petróleo. Desde então, não parou de se desenvolver devido ao cenário mundial e ações do governo federal. A Figura II.1 mostra a evolução dos biocombustíveis no Brasil.

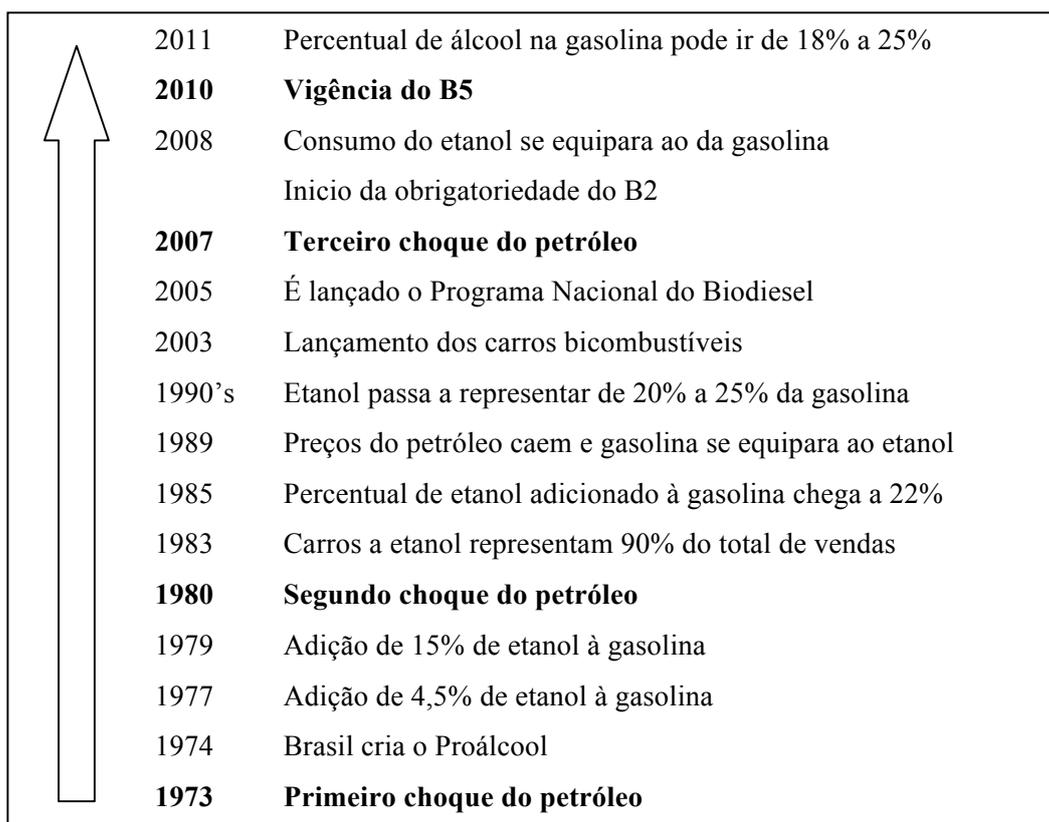


Figura II. 1 -Evolução dos biocombustíveis no Brasil.

Fonte: ANP (2012).

No ano de 2004 foi criado no Brasil o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) pelo governo federal. Este é um programa interministerial que tem como objetivo principal a implementação de forma sustentável, tanto técnica como econômica, da produção e do uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional por meio de geração de renda e emprego (MDA, 2012).

Ainda com o intuito de incentivar a produção do biodiesel, o governo brasileiro aprovou a resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), determinando a obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil. Sendo assim, desde 1º de janeiro de 2010, todo o óleo diesel veicular comercializado ao consumidor final deve conter 5% de biodiesel (ANP, 2012).

Como efeito destas medidas tomadas pelo governo federal e o interesse comercial das grandes empresas do ramo, pode-se verificar pela Figura II.2 o aumento da produção de biodiesel no país a partir de 2005.

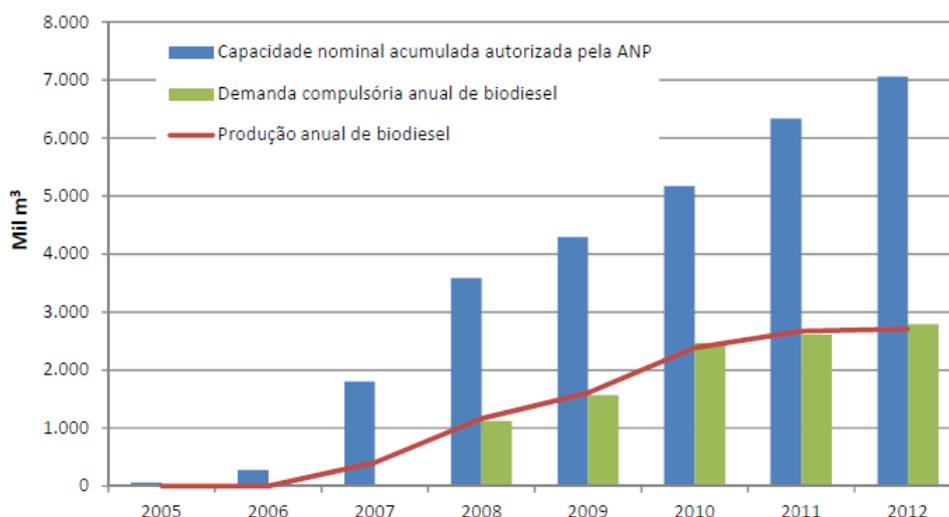


Figura II. 2- Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país.

Fonte: ANP (2013).

Hoje o país possui 68 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela a ANP. Destas apenas 7 não possuem autorização para comercialização. As plantas autorizadas para a comercialização do biodiesel produzido possuem capacidade de 19.316,04 m³/dia, sendo que esta capacidade pode ser aumentada em torno de 2.351,72 m³/dia, devido à autorização para construção de mais 4 plantas e ampliação com aumento da

capacidade de produção de mais 5, representando um acréscimo de 11% na capacidade atual (ANP, 2013).

A maior capacidade nominal autorizada pela ANP e maior produção de biodiesel no Brasil estão concentradas na Região Centro-Oeste, seguida da Região Sul, Sudeste, Nordeste e Norte, em ordem decrescente (ANP, 2013).

Devido a suas condições climáticas e sua extensão territorial o Brasil possui uma diversidade de matérias-primas para produção de biodiesel. Segundo o Boletim de Fevereiro de 2013 da ANP (ANP, 2013), as matérias-primas mais utilizadas para a produção do biodiesel no Brasil são óleo de soja (67,46%), gordura bovina (21,70%), óleo de algodão (4,41%), outros materiais graxos (2,69%), óleo de Palma/Dendê (1,31%), gordura de porco (1,23%), óleo de fritura (0,99%) e gordura de frango (0,22%).

Cada região do país possui um perfil de produção diferente devido às condições geográficas e econômicas do mesmo. É interessante destacar que o óleo de soja é mais utilizado na Região Centro-Oeste e Sul, com 83,41 e 67,61% respectivamente. Já a gordura bovina é mais utilizada na Região Sudeste e Norte, com 53,31 e 35,56%, respectivamente (ANP, 2013).

II.2 Matérias-primas

Levar em conta o custo da matéria-prima é primordial, isto porque a mesma representa de 60 a 85% do custo total de produção do biodiesel (KNOTHE et al., 2006; MATA et al., 2010; AHMAD et al., 2011). Por isso a busca por matérias-primas mais baratas tem como intuito a viabilidade econômica do biodiesel.

Alguns autores como Ahmad et al. (2011) e Lam e Lee (2011) classificam os diferentes tipos de matéria-prima para produção de biodiesel em três gerações. Assim a primeira geração é composta por óleo vegetal comestível como óleo de soja, canola, girassol e óleo de palma. A segunda geração é derivada de óleos não comestíveis como pinhão manso, óleo de jojoba, sementes de tabaco, óleo de salmão, óleo de fritura e gordura animal. Já a terceira geração é derivada de microalgas, leveduras, fungos e bioetanol produzido a partir da fermentação direta da celulose (AHMAD et al., 2011; LAM e LEE, 2011).

Dentre estas gerações, sabe-se que mais de 95% da matéria-prima para a produção de biodiesel é proveniente de óleos vegetais comestíveis. Porém, isto pode

gerar problemas de competição de matéria-prima e alimentos, aumentando tanto o custo dos óleos como o do biodiesel (LEUNG et al., 2010).

Problemas como este têm incentivado a produção de biodiesel a partir das matérias-primas da segunda e terceira gerações. No entanto, a quantidade disponível de matérias-primas da segunda geração como, por exemplo, óleos usados e gordura animal, não são suficientes para suprir a demanda de biodiesel (MATA et al, 2010).

Logo, o uso de matérias-primas da terceira geração, como as microalgas, podem também contribuir para a redução no uso de terras agricultáveis, além de ser uma matéria-prima com altas taxas de crescimento e excelente produtividade de lipídeos totais quando comparadas a outras oleaginosas (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010).

Por exemplo, as microalgas que contém apenas 30% de óleo em sua biomassa seca produzem 58.700 L/ha de biodiesel, já a canola produz 1.190 L/ha, o pinhão manso 1.892 L/ha (CHISTI, 2007), conforme mostra a Tabela II.1.

Tabela II. 1- Fontes de óleo para a produção de biodiesel.

Matéria-prima	Rendimento óleo (L/ha)
Milho	172
Soja	446
Canola	1.190
Pinhão manso	1.892
Coco	2.689
Óleo de palma	5.950
Microalga ^a	136.900
Microalga ^b	58.700

^a biomassa com 70% óleo (g). ^b biomassa com 30% óleo (g).

Fonte: Tabela adaptada de Chisti (2007).

Por esse e outros motivos, nas últimas décadas houve um aumento significativo nos estudos sobre o potencial de produção de biodiesel por meio das microalgas (LEWIS et al., 2000; MIAO e WU, 2006; XU et al., 2006).

II.3 Microalgas

As algas são reconhecidas como a forma de vida mais antiga (BRENNAN e OWENDE, 2010) e formam um grande grupo, tipicamente de microrganismos eucariontes ou procariontes fotossintéticos, que podem viver sob condições extremas devido a sua estrutura unicelular ou multicelular (MATA et al., 2010).

As mesmas estão presentes em todo o ecossistema, tanto aquático como terrestre e se estima que exista mais de cinquenta mil espécies, porém, apenas uma pequena quantidade é estudada (MATA et al., 2010).

As três classes principais das microalgas, em termos de abundância, são as diatomáceas, algas verdes e algas douradas e existem duas principais populações as filamentosas e algas do fito plâncton (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011).

As microalgas mais comuns são: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Scenedesmus* e *Spirulina sp.* e possuem teor de lipídeos totais entre 20 a 50% (AMARO et al., 2011).

Nascimento et al. (2013) estudaram doze espécies de microalgas com o intuito de verificar a melhor cepa para a produção de biodiesel. Levaram em consideração a produtividade de lipídeos e a qualidade dos mesmos usando como critério de seleção a composição em ácidos graxos. Por meio do estudo os autores sugeriram que, para a produção de um biodiesel de boa qualidade, deve-se utilizar uma mistura do óleo de diferentes espécies.

As microalgas começaram a ser estudadas como matéria-prima para a produção de biodiesel devido às vantagens que estas possuem em relação a outras matérias-primas, quais sejam:

- produzem o ano inteiro e a quantidade de óleo produzida excede o rendimento de qualquer oleaginosa (BRENNAN e OWENDE, 2010);
- possui inúmeras espécies com teor de lipídeos totais na faixa de 20 a 50% da biomassa seca, sendo que seus lipídeos em sua maioria são neutros (AHMAD et al., 2011);
- são fáceis de serem cultivadas e podem crescer com pouco ou nenhum cuidado (MATA et al., 2010), além de não exigir o uso de herbicidas e pesticidas (AHMAD et al., 2011);

- possuem um alto potencial de crescimento e sua taxa exponencial pode dobrar a biomassa em períodos tão pequenos como de 3,5 h; por serem microrganismos fotossintéticos utilizam a luz solar para a energia e CO₂ como fonte de carbono (CHISTI, 2007);
- não competem por terras utilizadas para a produção de comida, forragem ou outros produtos (AHMAD et al., 2011);
- podem crescer em uma série de ambientes que são inadequados para o cultivo de outras culturas, tais como água salobra, águas residuais ou terras impróprias para a agricultura convencional (AHMAD et al., 2011);
- podem ser cultivadas em águas residuais com o objetivo de remover os compostos NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₄³⁻, utilizando-os como fontes de nitrogênio e fósforo (BRENNAN e OWENDE, 2010; MATA et al., 2010) ou em fazendas e biorreatores (AHAMAD et al., 2011).
- a produção da biomassa de microalgas pode afetar a fixação de resíduos de dióxido de carbono reduzindo a emissão de gases de efeito estufa (1 kg de biomassa de alga seca requer cerca de 1,8 kg de CO₂) (AHMAD et al., 2011; LAM e LEE, 2011); e
- produzem subprodutos valiosos tais como biopolímeros, proteínas, pigmentos, hidratos de carbono e biomassa residual, que podem ser utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos, de nutrição animal e humana (MATA et al., 2010; AHMAD et al., 2011).

No entanto, a utilização de microalgas para a produção de biodiesel também possuem suas desvantagens. Brennan e Owende (2010) citam seis pontos que podem impedir o desenvolvimento de tecnologias que tornem a produção de biodiesel a partir de microalgas comercialmente viável. Estes pontos são:

1. as espécies selecionadas devem ser capazes de equilibrar a produção de biodiesel e subprodutos valiosos;
2. o alcance de uma maior eficiência fotossintética por meio do desenvolvimento de sistemas de produção contínuos;
3. o desenvolvimento de técnicas para o cultivo de espécies únicas, redução da evaporação e perdas de CO₂ por difusão;
4. potencial para um balanço de energia negativo após a contabilização de requisitos de bombeamento de água, transferência de CO₂, colheita e extração;

5. poucas plantas comerciais em operação, logo há uma falta de dados para plantas de larga escala;
6. incorporação de gases de combustão que não são adequados em concentração elevada, devido à presença de compostos tóxicos como NO_x e SO_x .

Devido a este e outros fatores pesquisas com intuito de minimizar ou sanar os problemas relacionados à seleção de espécie, cultivo, colheita, secagem, produção do biodiesel etc. são necessárias (Baumgärtner, 2011).

II.3.1 *Scenedesmus sp.*

O gênero mais comum de algas verdes é a *Scenedesmus sp.*, a qual inclui colônias com cenóbios planos ou alternados, formados por 2 a 16 células. Estas células podem ser elipsóides, ovóides, fusiformes ou lunadas (GODINHO et al., 2010). São encontradas no plâncton de água doce de rios, lagos e lagoas (BICUDO e MENEZES, 2005). A Figura II.3 apresenta a micrografia de uma colônia de *Scenedesmus sp.*

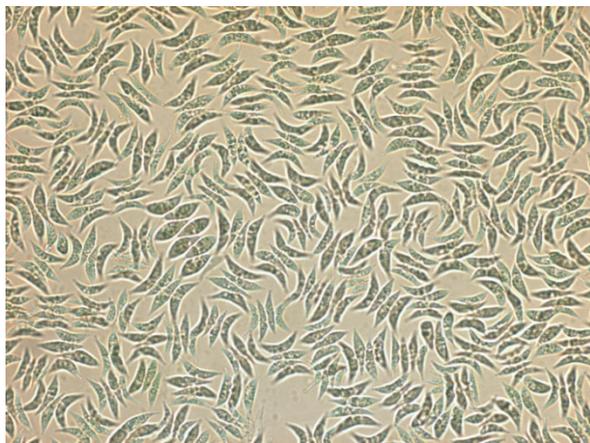


Figura II. 3-Colônia de *Scenedesmus sp.*

Fonte: Cultivo LCHBio.

Segundo Mata et al. (2010), a microalga *Scenedesmus sp.* possui uma produtividade de biomassa que fica entre 30 a 260 mg/L/dia e um teor de lipídeos totais que varia de 19,6 a 21,1% em biomassa seca.

Baumgärtner (2011) obteve uma produtividade de biomassa de $43,97 \pm 0,95$ mg/L/dia, ficando na faixa descrita por Mata et al. (2010). Porém, obteve um teor de lipídeos totais inferior, no valor de 8,3% em biomassa seca, realizando a extração pelo

método proposto por Bligh e Dyer (1959). Essa diferença encontrada no teor de lipídeos totais mostra que o mesmo está diretamente relacionado às condições de cultivo e ao método de extração utilizado.

II.3.2 Composição das microalgas

Segundo Becker (1994), as microalgas não são compostas apenas por lipídeos. A composição química das microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus dimorphus*, por exemplo, é de 8-56% de proteínas, 10-52% de carboidratos, 1,9 a 40% de lipídeos e 3 a 6% de ácidos nucleicos, conforme mostra a Tabela II.2.

Tabela II. 2- Composição química de diferentes microalgas em % de biomassa seca.

Microalga	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Ácido nucleico
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chamydantonas rheinhardii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Fonte: Tabela adaptada de Becker (1994).

Segundo Visentainer e Franco (2006), os livros definem lipídeos como um grupo de substâncias baseado na solubilidade, função química e orgânica. Podem ser agrupados de acordo com a sua estrutura química, sendo estas: triacilglicerídeos, diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos; ceras; fosfoglicerídeos; esfingolipídeos; esteróis e seus ésteres de ácidos graxos. Dentre estes compostos, os triacilglicerídeos são os mais abundantes e estão presentes em óleos e gorduras.

Os lipídeos são geralmente classificados em dois grupos baseados na polaridade da molécula, sendo estes, lipídeos neutros e lipídeos polares (HALIM et al., 2012). Já Krohn et al. (2011) classifica os lipídeos em três grupos os quais ele nomeia de lipídeos totais, lipídeos brutos e lipídeos neutros. A diferença entre as duas definições está descrita na Tabela II.3.

Tabela II. 3 – Classificação dos lipídeos.

Compostos	Halim et al. (2012)	Compostos	Kronh et al. (2011)
Acilgliceróis	Lipídeos neutros	Acilgliceróis	Lipídeos
Ácidos graxos livres		Ácidos graxos livres	neutros
Hidrocarbonetos		Hidrocarbonetos	
Esteróis		Esteróis	
Ceras		Ceras	
Ésteres de esteróis		Ésteres de esteróis	
Alcoóis		Alcoóis	
Pigmentos		Lipídeos neutros + Pigmentos	Lipídeos brutos
Fosfolipídeos e Glicolipídeos	Lipídeos polares	Lipídeos brutos + Fosfolipídeos e Glicolipídeos	Lipídeos totais

Fonte: Tabela adaptada de Kronh et al. (2011) e Halim et al. (2012).

Nas microalgas, os lipídeos neutros têm como função o armazenamento de energia na célula, enquanto os lipídeos polares compõem a segunda camada da membrana celular (HALIM et al., 2012).

Para a produção de biodiesel puro, apenas os triacilglicerídeos e os ácidos graxos livres são os lipídeos de interesse, sendo os mesmos classificados como lipídeos

neutros. No entanto, as classes dos lipídeos neutros também possuem compostos que não são convertidos em biodiesel como os hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos (HU et al., 2008; WAHLEN et al., 2011; KROHN et al., 2011; HALIM et al., 2012, NASCIMENTO et al., 2013).

A Figura II.4 mostra a composição de lipídeos das microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata* e de uma mistura de espécies nativas provenientes de lagos do estado do Minnesota, EUA, sendo estas, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.*, denominada *Wild*. Pode-se observar que a fração de lipídeos neutros e, portanto, a quantidade de triacilglicerídeos e ácidos graxos livres disponíveis para a produção de biodiesel é apenas uma pequena fração dos lipídeos totais. Estes compreendem apenas 30% dos lipídeos totais para a microalga *Wild* e *D. tertiolecta* e 50% para a microalga *N. oculata* (KROHN et al., 2011).

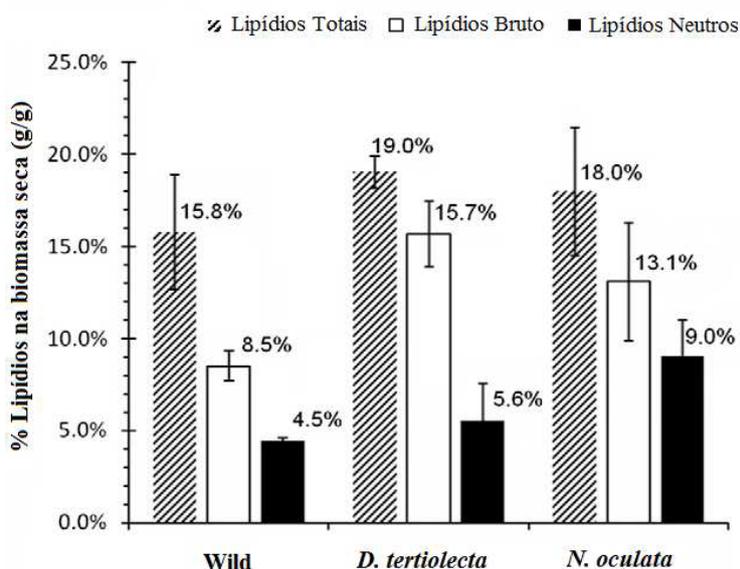


Figura II. 4 - Análise da composição lipídica das microalgas *Wild*, *D. tertiolecta* e *N. Oculata*.

Fonte: Krohn et al. (2011).

De fato, Halim et al. (2012) compararam a composição de lipídeos das microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Pavlova lutheri* e *Isochrysis sp.*, nas diferentes fases de crescimento (logarítmica e estacionária). Apesar de a fase estacionária possuir uma abundância de lipídeos polares (51 a 57%) contém altos níveis de triacilglicerídeos (20 a 41% dos lipídeos totais), parecendo ser mais atrativa para a produção de biodiesel.

Devido à forma com que os lipídeos são classificados deve-se observar se o teor de lipídeos descrito na literatura se refere ao teor de lipídeos totais ou aos compostos de interesse para a produção de biodiesel, ou seja, os triacilglicerídeos e ácidos graxos livres.

Na literatura o que geralmente se encontra é o teor de lipídeos totais das microalgas, sendo que estes variam consideravelmente de uma espécie para outra, com valores de 5 a 77% em termos de biomassa seca, conforme mostra a Tabela II.2 (CHISTI, 2007). O mesmo pode ser aumentado otimizando os fatores relacionados ao crescimento da microalga, tais como o controle do nível de nitrogênio, luminosidade, temperatura, salinidade, concentração de CO₂ e procedimento de colheita (BRENNAN e OWENDE, 2010).

A maioria dos lipídeos presentes nas microalgas contém ácidos graxos, que possuem de 12 a 22 carbonos e podem ser saturados ou insaturados. O número de duplas ligações da cadeia dos ácidos graxos não ultrapassam 6 e em sua maioria são isômeros cis (MEDINA et al., 1998; HALIM et al., 2012). Cada microalga possui uma composição em ácidos graxos diferente. A Tabela II.4 apresenta a composição em ácidos graxos das microalgas *Scenedemus sp.* e *Scenedesmus obliquus*.

A composição em ácidos graxos e o número de insaturações dos ácidos graxos influenciam diretamente as características finais do biodiesel, tais como número de cetano, saponificação, grau de insaturação, índice de iodo, ponto de entupimento de filtro a frio e outros (RAMOS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013).

Segundo Demirbas e Demirbas (2011), o óleo das microalgas *Chlorella protothecoides* e *Cladophora fracta* possui alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, sendo 62,8% e 50,9%, respectivamente. Altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados tendem a diminuir a estabilidade do biodiesel. No entanto, os mesmos possuem ponto de fusão mais alto que os ácidos graxos monoinsaturados ou saturados, produzindo um biodiesel com melhores propriedades a temperaturas baixas, como o ponto de entupimento a frio. Para Halim et al. (2012), os ácidos graxos poliinsaturados são desejáveis, pois são responsáveis pela baixa volatilidade, porém, também, são responsáveis pela baixa estabilidade à oxidação.

Tabela II. 4 - Composição em ácidos graxos das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Scenedesmus obliquus*.

Ácidos graxos	<i>Scenedesmus sp.</i> ^a	<i>Scenedesmus obliquus</i> ^b
C 4:0	10,5*	1,25
C 6:0	2,54	2,23
C 8:0	2,94	0,68
C 10:0	1,11	1,91
C 14:0	0,75	1,06
C 14:1	0,63	n.d.
C 16:0	12,1	52,07
C 16:1	1,83	n.d.
C 17:0	0,54	n.d.
C 18:0	2,71	7,48
C 18:1	21,1	21,46
C 18:2	10,1	7,49
C 18:3	30,5	2,83
C 20:1	0,81	n.d.
C 22:1	1,85	n.d.
NI	-	4,43

*Composição do óleo em percentagem mássica.

n.d. – Não detectado. N.I. – Não Identificado.

Fonte: Tabela adaptada de ^aBaumgärtner (2011); ^bNascimento et al. (2013).

Thomas et al. apud Amaro et al. (2010) analisaram a composição em ácidos graxos de sete espécies de microalgas e observaram que todas sintetizaram os ácidos graxos C14:0, C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, além de outros compostos específicos de cada espécie. Destaca-se que as condições de cultivo e fase de crescimento influenciam diretamente neste perfil. Como exemplo, a deficiência de nitrogênio e o *stress* salino induziram o acúmulo de ácidos graxos C18:1 em todas as espécies estudadas.

Xu et al. (2006) estudaram a qualidade do biodiesel produzido a partir da microalga *Chlorella protothecoides*. O perfil e a quantidade de ésteres metílicos de ácidos graxos encontrados no biodiesel são apresentados na Tabela II.5. O componente mais abundante foi o éster metílico do ácido 9-octadecenóico (ácido oléico), com um teor de 60,84%, ou seja, predominância de ácidos graxos monoinsaturados.

Tabela II. 5 - Ésteres metílicos de ácidos graxos no biodiesel de microalga *Chlorella protothecoides*.

Simbologia	Nomenclatura UIQPA*	Nomenclatura usual	Composição (%)
C14:0	Éster metílico de ácido tetradecanóico	Ácido mirístico	1,31
C16:0	Éster metílico de ácido hexadecanóico	Ácido palmítico	12,94
C17:0	Éster metílico de ácido heptadecanóico	Ácido margárico	0,89
C18:0	Éster metílico de ácido octadecanóico	Ácido esteárico	2,76
C18:1n-9	Éster metílico de ácido 9-octadecenóico	Ácido oléico	60,84
C18:2n-6	Éster metílico de ácido 9,12-octadecadienóico	Ácido linoleico	17,28
C19:1n-9	Éster metílico de ácido 10-nonadecenóico	-	0,36
C20:0	Éster metílico de ácido eicosanóico	Ácido araquídico	0,35
C20:1n-9	Éster metílico de ácido 11-eicosenóico	Ácido gondóico	0,42

*UIQPA – União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Fonte: Tabela adaptada de Xu et al. (2006) e Visentainer e Franco (2006).

O total de ésteres metílicos de ácidos graxos com 18 carbonos encontrados foi acima de 80%, resultando em uma alta qualidade de biodiesel, conforme pode ser observado por meio de algumas propriedades descritas na Tabela II.6. Deste modo, pode-se verificar que as propriedades físicas e combustíveis do biodiesel de microalga são comparáveis à do diesel comum.

Tabela II. 6 - Propriedades do biodiesel de óleo de microalgas e do diesel de petróleo.

Propriedades	Biodiesel de óleo de microalgas	Combustível Diesel (Petrodiesel)
Densidade (kg/L)	0,864	0,838
Viscosidade (mm ² /s, cSt a 40 °C)	5,2	1,9-4,1
Ponto de Fulgor (°C)	115	75
Ponto de fusão (°C)	-12	-50 a 10
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	-11	-3,0 (max. -6,7)
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,374	Max. 0,5
Razão H/C	1,81	1,81

Fonte: Tabela adaptada de Xu et al. (2006).

II.3.3 Outras aplicações

As microalgas são produzidas em larga escala desde 1960 no Japão para uso como aditivo alimentar. Nas décadas de 70 e 80 a sua produção se expandiu para outros países como Estados Unidos, Índia, Israel e Austrália (BRENNAN e OWENDE, 2010). Em 2004 a produção de microalgas foi de 7000 toneladas de matéria seca. A Tabela II.7 mostra os gêneros produzidos, os países produtores e sua aplicação.

Tabela II. 7 - Produção e diferentes usos das microalgas.

Microalga	Produção (t/ano)*	País Produtor	Aplicação e produtos
<i>Spirulina</i>	3000	China, Índia, EUA, Japão	Nutrição humana e animal Cosméticos Ficobiliproteínas
<i>Chlorella</i>	2000	Taiwan, Alemanha, Japão	Nutrição humana Aquicultura Cosméticos
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Austrália, Israel, EUA, Japão	Nutrição humana Cosméticos Betacaroteno

* Biomassa seca.

Fonte: Adaptado de Brennan e Owende (2010).

Segundo Brennan e Owende (2010), as microalgas podem ser utilizadas como biofertilizantes e também para nutrição humana, animal e na aquicultura. Com alto valor agregado as microalgas são utilizadas como fonte de ácidos graxos polinsaturados e carotenóides, tais como betacaroteno e astaxantina, que são amplamente utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, na função de agente colorante de alimentos, fonte de vitamina A, aditivos de cosméticos etc. (BRENNAN e OWENDE, 2010; MATA et al., 2010).

II.4 Produção de ésteres

A reação de transesterificação é a rota tecnológica mais utilizada para a produção de ésteres alquílicos de óleos e gorduras (biodiesel). A mesma ocorre entre um triacilglicerol e um álcool, de cadeia curta, na presença de um catalisador, formando ésteres e glicerol.

Segundo Knothe et al. (2006), em princípio a transesterificação é uma reação reversível, porém, durante a produção do biodiesel a reação reversa não ocorre, pois o glicerol que é formado na reação não é miscível ao produto, levando a um sistema bifásico.

Este sistema bifásico ocorre devido à baixa solubilidade do glicerol nos ésteres e a sua separação pode ser feita por decantação ou centrifugação, sendo que a fase superior é composta pelos ésteres e a fase inferior pelo glicerol bruto e as impurezas. Para facilitar a separação do glicerol pode ser adicionada água ao final da reação (GERPEN, 2005).

A reação de transesterificação tem como vantagem a redução da viscosidade de óleos vegetais e, assim, permitir o seu uso em motores diesel sem causar problemas operacionais como a formação de incrustações (KNOTHE et al., 2006).

Para realizar a transesterificação é necessário realizar a extração do óleo da microalga. Porém, esta é uma etapa que requer muito cuidado e ainda necessita de evolução tecnológica, pois pode causar perdas significativas no rendimento em óleo. Como alternativa, iniciaram-se estudos de transesterificação *in situ* ou transesterificação direta.

II.4.1 Transesterificação *in situ*

A transesterificação *in situ* consiste em eliminar a etapa de extração do óleo, realizando a reação direta da biomassa seca da microalga. Isto simplifica o processo de produção de biodiesel, permitindo que a extração do óleo e a transesterificação ocorra em uma única etapa (LAM e LEE, 2011), como mostra a Figura II.5.

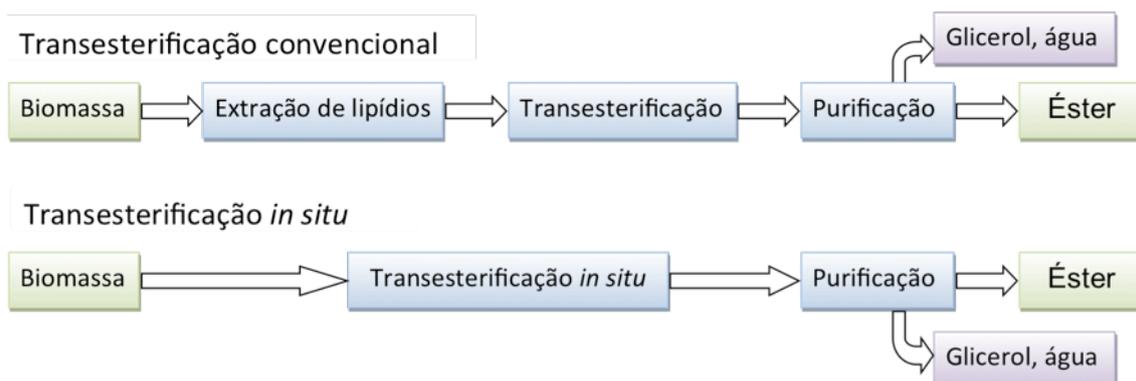


Figura II. 5- Comparação entre a transesterificação convencional e a transesterificação *in situ*.

Fonte: Figura adaptada de Velasquez-Orta et al. (2012).

Já segundo Lewis et al. (2000) e Halim et al. (2012), a transesterificação *in situ* foi derivada originalmente por Lepage e Roy em 1984, como um método rápido para analisar os ácidos graxos contidos em tecido adiposo e no leite.

Logo, pesquisadores estão recorrendo à transesterificação *in situ*, pois a mesma quando comparada à extração do óleo seguida da transesterificação tem demonstrado uma melhora significativa no rendimento em ésteres e elimina as dificuldades encontradas no processo de extração do óleo das microalgas (HALIM et al., 2012).

Johnson e Wen (2009), Ehimen et al. (2010), Wahlen et al. (2011), Haas e Wagner (2011), Velasquez-Orta et al. (2012) estudaram a influência de diversos fatores na produção de ésteres, tais como tempo de reação, tipo de catalisador, agitação, umidade da biomassa, razão molar álcool:óleo, utilização de solventes etc., os quais alguns serão discutidos a seguir.

II.4.1.1 Álcool

O álcool possui um papel fundamental na transesterificação *in situ*, pois age como solvente, extraíndo os lipídeos da biomassa, e reagente, convertendo triacilglicerídeos em ésteres (WAHLEN et al., 2011).

Os álcoois de cadeia curta que podem ser utilizados na reação de transesterificação são metanol, etanol, propanol e butanol. Dentre estes, o mais utilizado é o metanol (LEUNG et al., 2010; STAMENKOVIC et al., 2011). Este fato é explicado pelo custo, propriedades físico-químicas, facilidade na separação de fases e disponibilidade (STAMENKOVIC et al., 2011).

Apesar das vantagens já citadas, o metanol apresenta um baixo ponto de ebulição, o que gera um grande risco de explosão associado aos seus vapores. Além disso, o metanol e o metóxido são materiais extremamente perigosos e devem ser manuseados com cuidado.

Nos Estados Unidos o metanol chega a ser 50% mais barato que o etanol. No entanto, isto não é uma realidade para todos os países. O Brasil, por exemplo, possui disponibilidade de matéria-prima e tecnologia para a produção de etanol que permite a obtenção de um produto mais barato que o metanol (KNOTHE et al., 2006). Além disso, o etanol possui como uma das suas vantagens o alto poder de dissolução em óleos vegetais e sua baixa toxicidade quando comparado ao metanol (STAMENKOVIC et al., 2011).

Wahlen et al. (2011) avaliaram cinco álcoois diferentes, sendo estes metanol, etanol, 1-butanol, isobutanol e álcool isoamílico na extração de óleo e na produção de ésteres por meio da transesterificação *in situ* da microalga *C.gracilis*. Os resultados obtidos indicaram que o etanol foi o que mais extraiu triacilglicerídeos e o metanol o que menos extraiu. Porém, quando estudaram a transesterificação *in situ* na presença de um catalisador ácido, o álcool não influenciou significativamente na produção de ésteres, com valores de ésteres variando entre 28,7 e 36,9 mg de éster/100 mg de biomassa seca para os álcoois isobutanol e 1-butanol, respectivamente. Sendo assim os autores optaram por otimizar o processo utilizando o álcool com o menor custo (metanol).

II.4.1.2 Catalisador

Em geral a reação de transesterificação pode ser realizada por catálise ácida, básica ou enzimática. A catálise enzimática é pouco utilizada comercialmente devido ao longo tempo de reação e seu alto custo (LEUNG et al., 2010). Já catalisadores ácidos bem como os básicos são os mais utilizados.

Para a catálise básica os catalisadores mais comumente utilizados são hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio, devido à economia que os mesmos trazem quando utilizados em baixas temperatura e pressão, além de oferecerem altas conversões (LEUNG et al., 2010).

Porém, a catálise básica tem como fator limitante a sensibilidade do catalisador com a água e os ácidos graxos livres da matéria-prima. A presença da água pode causar

a reação da mesma com os triacilglicerídeos formando ácidos graxos livres (KNOTHE et al., 2006).

Velasquez-Orta et al. (2012) avaliaram o uso de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio na transesterificação *in situ* de *Chlorella vulgaris* e obtiveram maiores rendimentos em ésteres metílicos quando foi utilizado o catalisador básico, em reações mais curtas (75 minutos) alcançando uma conversão de $77,6 \pm 2,3\%$.

Já Ehimen et al. (2010) utilizaram ácido sulfúrico e obtiveram maior rendimento com 2 a 4 horas de reação, dependendo da temperatura utilizada. Isto mostra que a catálise ácida gera reações mais lentas, por este motivo, a mesma tem sido menos utilizada que a básica.

No entanto, para utilização de catalisadores alcalinos a matéria-prima deve conter no máximo 5% de ácidos graxos livres, pois os mesmos podem reagir com o catalisador básico produzindo sabão, gerando dificuldades para a purificação do biodiesel (KNOTHE et al., 2006).

Já na catálise ácida não são necessários pré-tratamentos devido à presença de ácidos graxos livres. Esta vantagem favorece o uso de catalisadores ácidos quando a matéria-prima para a transesterificação contém uma acidez maior que 2,0 mg KOH/g (AL-ZUHAIR, 2007; SHARMA et al., 2008). Devido à acidez característica do óleo de microalgas os catalisadores ácidos são os mais recomendados. De fato, Baumgärtner (2011) verificou um índice de acidez de 4,9 mg KOH/g para o óleo da microalga *Scenedesmus sp.*

II.4.1.3 Temperatura

O aumento da temperatura possui influência favorável no rendimento em ésteres. Na transesterificação básica a temperatura usualmente utilizada fica entre 45 e 65 °C (DEMIRBAS, 2009).

Ehimen et al. (2010) realizaram a transesterificação *in situ* de *Chlorella* nas temperaturas de 23, 30, 60 e 90 °C. Os resultados obtidos indicaram que a conversão do óleo de microalgas em ésteres metílicos aumentava com o aumento da temperatura e a razão molar álcool:óleo. Para as reações realizadas a 90 °C o equilíbrio da reação era alcançado em tempos mais curtos, atingindo 70% e 92% de conversão depois de 15 min e 1 h de reação, respectivamente.

Ainda segundo Ehimen et al. (2010), conversões mais altas podem ser observadas pelo uso de temperaturas mais altas que o ponto de ebulição dos reagentes. Porém, o processo de aquecimento e necessidade de pressão podem inibir o uso de altas temperaturas. Os autores concluem que a temperatura de 60 °C é melhor se fossem considerados o consumo total de energia e o custo de operação de todo o processo de produção do biodiesel.

Assim como Ehimen et al. (2010) para Johnson e Wen (2009), Baumgärtner (2011), Wahlen et al. (2011) e Velasquez-Orta et al. (2012) as temperaturas de 60 e 90 °C são as mais adequadas para a transesterificação *in situ*, pois as mesmas levaram a maiores rendimentos em ésteres.

II.4.1.4 Razão molar álcool:óleo

A conversão de óleos vegetais em ésteres por meio de catálise ácida ou básica é influenciada pelo volume de álcool utilizado por unidade de óleo (DEMIRBAS, 2009; WAHLEN et al., 2011). Para Wahlen et al. (2011), esperava-se que o volume de álcool utilizado na transesterificação *in situ* da biomassa algácea tivesse um efeito similar no rendimento em ésteres a partir dos lipídeos da microalga. No entanto, observou que a razão molar álcool:óleo necessária para maximizar o rendimento em ésteres, na transesterificação *in situ*, é muito maior que a razão molar álcool:óleo de 30:1 utilizada na transesterificação convencional.

A influência da razão molar álcool:óleo na transesterificação convencional se difere bruscamente quando comparada à transesterificação *in situ*. Na transesterificação a partir do óleo vegetal usualmente são utilizadas razões molares álcool:óleo variando entre 3:1 a 84:1 (MIAO E WU, 2006; VELASQUEZ-ORTA et al., 2012). Já quando é realizada a transesterificação *in situ* estes valores sobem para 105:1 a 800:1 (EHIMEN et al., 2010; VELASQUEZ-ORTA et al., 2012).

Freedman et al. (1984) estudaram a influência da razão álcool:óleo na reação de transesterificação do óleo de soja e observaram que quando a razão álcool:óleo é muito baixa, quantias significativas de mono e diacilglicerídeos estão presentes no produto final. Foi necessário uma razão molar álcool:óleo de 6:1 para que a reação fosse completa, ou seja, que todos os triacilglicerídeos tivessem reagidos formando ésteres alquílicos.

Segundo Gerpen (2005), os mono e diacilglicerídeos de ácidos graxos saturados presentes no biodiesel se cristalizam facilmente e podem causar obstrução do filtro de combustível e outros problemas de desempenho nos motores automotivos.

Velasquez-Orta et al. (2012) realizaram a transesterificação *in situ* utilizando catalisador básico e razões molares álcool:óleo entre 300:1 a 800:1. Foi observado que o aumento desta razão diminui a quantidade de catalisador necessária para promover um aumento no rendimento em ésteres. Também observaram que quando a razão molar álcool:óleo era baixa e a quantidade de catalisador básico alta eram obtidos rendimentos baixos em ésteres metílicos. Isto ocorria provavelmente pela produção de sabão em vez de ésteres. Por outro lado, quando a razão molar era alta o rendimento em ésteres metílicos também diminuía, provavelmente, por diluir o catalisador (VELASQUEZ-ORTA et al., 2012). Assim, para Velasquez-Orta et al. (2012) o rendimento máximo em ésteres metílicos alcançado foi de $77,6 \pm 2,3\%$ após 75 minutos de reação, com razão molar álcool:óleo de 600:1 e concentração de 0,15 molar de catalisador básico.

Ehimen et al. (2010) variaram a razão molar álcool:óleo na transesterificação *in situ* de 105:1 a 524:1 e observaram que a utilização de razões molares superiores a 315:1 não resultaram em rendimentos em ésteres metílicos significativamente diferentes.

Observa-se que altas razões molares álcool:óleo são utilizadas, pois o álcool deve agir ao mesmo tempo como solvente, extraíndo lipídeos, e como reagente transformando triacilglicerídeos em ésteres (WAHLEN et al., 2011), como já explicado anteriormente. Para Lam e Lee (2011) e Xu e Mi (2011) a razão molar álcool:óleo pode ser diminuída com a adição de um cosolvente na reação.

II.4.1.5 Solvente

Xu e Mi (2011) estudaram o efeito da utilização de um solvente ou cosolvente, como denominado pelos autores, na transesterificação *in situ* sob condições de mínimo consumo de energia, ou seja, sem aquecimento e agitação.

Estes autores consideraram o cosolvente como um “super agente” que é capaz de extrair o óleo e ser miscível a ele e ao mesmo tempo ser miscível também ao álcool. Esta capacidade do solvente promove a formação espontânea de um sistema monofásico no meio reacional, deixando de ser essenciais fatores como agitação e aquecimento para o desenvolvimento da reação.

No entanto, existem alguns critérios para a seleção do solvente adequado a ser utilizado na transesterificação *in situ*. Para Xu e Mi (2011) as características do solvente são a chave do sucesso da transesterificação *in situ*. Algumas destas características estão descritas na Tabela II.8.

Tabela II. 8 – Critérios para seleção de cosolventes.

Características do cosolvente	Descrição
Imiscível em água	A presença de água no meio reacional diminuiu significativamente o rendimento em ésteres. A imiscibilidade do cosolvente em água promove um ambiente livre de água para a transesterificação <i>in situ</i> . Reduz a necessidade e os custos com a secagem da microalga.
Miscível em triacilglicerídeos e em álcool	A miscibilidade com os triacilglicerídeos permite que o cosolvente extraia o óleo da microalga. A miscibilidade com o álcool permite que a transesterificação <i>in situ</i> ocorra em um ambiente homogêneo sem a necessidade de agitação.
Quimicamente inerte durante a transesterificação	Garante o progresso da transesterificação <i>in situ</i> , a pureza dos produtos e a facilidade de reciclar o cosolvente.
Densidade diferente da microalga	A diferença entre as densidades garante que a microalga fique separada do cosolvente flutuando ou decantando espontaneamente. Assim, não é necessária a centrifugação para a recuperação do cosolvente e dos ésteres produzidos.
Baixa toxicidade	A baixa toxicidade beneficia a saúde dos trabalhadores e do ambiente.

Fonte: Tabela adaptada de Xu e Mi (2011).

Xu e Mi (2011) realizaram a transesterificação *in situ* da microalga *Spirulina sp.*, utilizando metanol, hidróxido de potássio e avaliaram os solventes tolueno, éter

etílico e diclorometano. Entre os três solventes utilizados o tolueno foi o que apresentou o melhor rendimento em ésteres. Os autores concluem sugerindo que além dos critérios de seleção já citados para a escolha do cosolvente, deve ser levado em consideração a espécie da microalga utilizada.

Johnson e Wen (2009) realizaram a transesterificação *in situ* utilizando a microalga *S. limacinum*, metanol e ácido sulfúrico. Os solventes clorofórmio, hexano e éter petróleo foram avaliados. Verificou-se que a utilização do solvente elevou significativamente o rendimento em ésteres, sendo essencial para a realização da reação. Com o uso do solvente clorofórmio e hexano o rendimento foi de 10 a 20 % maior, quando comparado ao método extração/transesterificação.

II.4.1.6 Agitação

Em geral, os estudos que utilizaram agitação no processo de transesterificação tinham como objetivo em comum o aumento do rendimento em ésteres. Segundo Stamenkovic et al. (2011), a agitação inibe a formação de uma emulsão estável e aumenta a transferência de massa dos triacilglicerídeos da fase óleo para a área interfacial.

Ehimen et al. (2010) avaliaram, dentre outros fatores, o efeito da agitação na transesterificação *in situ* da microalga *Chlorella*. O efeito da agitação foi estudado como estratégia de redução de gastos. Foram avaliadas quatro condições diferentes, sendo estas sem agitação, agitação contínua, agitação apenas na primeira hora de reação e agitação intermitente (uma hora com agitação e uma hora sem agitação). Os autores observaram que quando não havia agitação a conversão de equilíbrio era reduzida significativamente, indicando que a agitação auxilia na miscibilidade inicial dos reagentes. Como conclusão foi verificado que pode ser obtido uma redução de custos de energia com a agitação intermitente, sem prejuízos no rendimento em ésteres.

II.4.1.7 Umidade

Em reações catalisadas tanto por ácido como por base, a presença de água possui efeito negativo no rendimento em ésteres (DEMIRBAS, 2009).

Ehimen et al. (2010) avaliaram a influência da umidade da biomassa no rendimento em ésteres. No estudo a umidade da biomassa variou de 72,5% (após a

colheita) a 0% (totalmente seca). Os resultados obtidos indicaram que o aumento da umidade possui efeito negativo no rendimento em ésteres, e que a biomassa com teor de umidade maior que 31,7% inibe a reação. Utilizando uma biomassa com 0,7% de umidade foi possível obter uma conversão de 81,7%.

Wahlen et al. (2011) também avaliaram a influência da umidade no rendimento em ésteres na transesterificação *in situ* de microalga. Para isto, foi adicionada água destilada à biomassa seca da microalga *C. gracillis*, na proporção de 10 a 100% (m/m) água:biomassa seca. Os resultados obtidos indicaram que o aumento progressivo da umidade diminuía o rendimento em ésteres. Nas reações realizadas utilizando amostras com a mesma quantidade de água e biomassa (100% (m/m)) foi obtido apenas 50% do rendimento máximo em ésteres que foi alcançado por meio da reação realizada com a biomassa seca.

II.5 Conclusões da revisão bibliográfica

O biodiesel é uma alternativa viável aos combustíveis de origem fóssil, que teve seu consumo elevado significativamente no Brasil, na última década. Isto se deu, principalmente, devido às ações do governo federal e do interesse das empresas do ramo. No entanto, para suprir a demanda pelo mesmo é preciso realizar buscas por matérias-primas capazes de produzir um biodiesel dentro dos padrões de qualidade.

A biomassa de microalgas está entre as matérias-primas promissoras para produção de biodiesel. Porém, o processo de produção de biodiesel utilizando microalgas encontra inúmeras barreiras tecnológicas, entre elas, está a extração do óleo. Visando à eliminação desta barreira os pesquisadores começaram a estudar a transesterificação *in situ* da biomassa das microalgas.

A transesterificação *in situ* consiste em eliminar a etapa de extração do óleo, realizando a reação direta da biomassa seca da microalga, simplificando o processo de produção de biodiesel e permitindo que a extração do óleo e a transesterificação ocorram em uma única etapa (LAM e LEE, 2011).

Pesquisadores estudaram a influência de diversos fatores na produção de ésteres via transesterificação *in situ*, em busca de altos rendimentos em ésteres. Porém, primeiramente, é preciso selecionar a espécie adequada e o meio de cultivo capaz de maximizar os compostos de interesse, ou seja, os triacilglicerídeos e ácidos graxos livres.

Por meio dos trabalhos já existentes, verifica-se que os alcoóis adequados para a transesterificação são o metanol e o etanol, podendo optar pelo álcool que possui o menor custo. Devido à acidez do óleo das microalgas, sabe-se que o catalisador ácido é o mais adequado, pois não se faz necessário pré-tratamentos devido a sua acidez superior a 2,0 mg KOH/g, mesmo proporcionando reações mais lentas.

Nota-se, também, que parâmetros como temperatura, razão molar álcool:óleo, umidade e agitação são fundamentais para se alcançar alto rendimento em ésteres. Segundo a literatura os melhores rendimentos em ésteres foram obtidos por meio dos seguintes parâmetros: temperaturas entre 60 e 90 °C, com razão molar álcool:óleo variando entre 300:1 a 600:1, umidade máxima da biomassa de 30% e utilizando agitação, no mínimo, na primeira hora da reação.

Cabe ressaltar que fatores como condições de cultivo e processos de colheita e secagem interferem na quantidade e qualidade dos lipídeos disponíveis na biomassa seca.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados para a produção da biomassa, colheita e secagem, foram baseados nos resultados obtidos por Baumgärtner (2011) e Baumgärtner et al. (2013a), também realizado no Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel (LCHBio) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

III.1 Produção da biomassa

As cepas da microalga *Scenedesmus sp.* foram gentilmente fornecidas pelo laboratório de Limnologia, Ecotecnologia e Biomanipulação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). As mesmas foram cultivadas no meio de cultivo MC proposto por Watanabe (1960), conforme descrito na Tabela III.1 e III.2.

Tabela III. 1 - Meio MC para cultivo de *Scenedesmus sp.*

Reagente	Quantidade (g/L)
KNO ₃	1,25
KH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,25
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,02
Solução A5 (micronutrientes)	1 mL por litro

Fonte: Watanabe (1960).

Tabela III. 2 - Composição da Solução A5.

Reagente	Quantidade (g/L)
H ₃ BO ₃	2,9
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,08
3(NH ₄) ₂ O .7MoO ₃ . 4H ₂ O	0,018

Fonte: Watanabe (1960).

O cultivo das microalgas foi realizado utilizando o meio sintético, descrito anteriormente, com uma diluição volumétrica de inóculo:meio nutricional:água deionizada de 1:1:8.

A colheita da biomassa foi realizada por floculação prévia da biomassa, utilizando-se o floculante natural Tanfloc - SL, (produzido e gentilmente doado pela empresa Tanac). A operação de floculação foi seguida por decantação e filtração em tela de 20 mesh, para, então, obter-se a biomassa algácea.

A secagem da biomassa algácea foi realizada em estufa, na temperatura de 60 °C, até massa constante. Após a colheita e secagem a mesma foi macerada, até formar um pó fino, que foi separado em peneira de 35 mesh, determinando o diâmetro médio das partículas em 0,5 mm. Posteriormente, a biomassa seca foi misturada, formando um lote único e armazenada em potes plásticos, em temperatura próxima a -8 °C (freezer), para que fossem mantidas as propriedades da biomassa.

III.2 Extração e purificação do óleo

O óleo da microalga *Scenedesmus sp.* foi extraído pelo método de lavagem sucessiva, utilizando n-hexano como solvente, conforme descrito por Baumgärtner et al. (2013b), pois segundo os autores, este método combinado com o solvente n-hexano levam a um perfil de ácidos graxos característico da maioria das oleaginosas utilizadas para a produção de biodiesel.

Primeiramente pesou-se 1 grama de biomassa seca, sendo esta transferida para um tubo tipo Falcon, ao qual foram adicionados 10 mL de solvente. Em seguida, o tubo foi colocado em um banho, sob agitação, a 60 °C, por 30 min.

Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm e o solvente sobrenadante foi transferido para um balão previamente pesado (P1). Ao tubo contendo a biomassa residual adicionaram-se mais 10 mL de solvente e este foi levado novamente ao banho, por mais 30 minutos. Esse processo se repetiu por 6 vezes.

Ao final, o solvente no balão, contendo a matéria graxa, foi evaporado em um evaporador rotativo. O balão contendo a matéria graxa foi seco em estufa, a 60 °C, até massa constante (P2). O teor de lipídeos totais foi determinado a partir da diferença de massa entre P2 e P1.

Após este procedimento de extração da matéria graxa, foi necessário fazer a purificação da mesma para remover compostos indesejáveis para a reação de transesterificação, tais como a clorofila, fosfolípidios e glicolipídios.

A purificação do óleo foi feita utilizando processo de adsorção seletiva em coluna de leito fixo. Primeiramente, a matéria graxa obtida anteriormente foi diluída em n-hexano na proporção 1:50 ($m_{\text{óleo}}: mL_{\text{n-hexano}}$) e o leito foi recheado com carvão ativado de osso animal granulado, cedido pela empresa Bonechar Carvão do Brasil LTDA. Utilizou-se uma coluna de vidro de aproximadamente 30 cm de altura, contendo 6 g de carvão ativado.

O solvente n-hexano, utilizado para eluir o extrato pela coluna, foi recuperado em um evaporador rotativo e os lipídeos neutros obtidos foram secos em estufa a 60 °C, para a completa remoção do solvente. Cabe ressaltar que foram realizadas doze extrações e purificações.

Com o intuito de verificar se o processo de purificação foi eficiente na remoção dos pigmentos, realizou-se a análise por espectroscopia de varredura no UV-vis da amostra na faixa de 200 a 1100 nm após a extração e após a purificação. Os espectros obtidos foram comparados com o espectro de uma amostra de óleo de soja comercial.

III.3 Caracterização do óleo

Para a caracterização do óleo obtido foi determinado apenas o índice de acidez e a composição em ácidos graxos obtidos frente à extração, conforme descrito a seguir.

III.3.1 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez é um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo, definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 grama de amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

O índice de acidez foi determinado pelo método de Adolfo Lutz, que consistiu em pesar 2 g de óleo em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL da solução de éter:álcool (2:1) e agitar a amostra até a dissolução total da mesma. Em seguida, são adicionadas 2 gotas de indicador fenolfotaleína 1%, sendo a amostra titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L, até o aparecimento de uma coloração rósea, a qual deve persistir por aproximadamente 30 segundos. Assim, o índice de acidez é dado por:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \times f \times 0,561}{P_o} \text{ (mg KOH/g de óleo)} \quad (1)$$

sendo que:

V é o volume da solução de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação (mL);

f é o fator de correção da solução de NaOH 0,01 mol/L;

P_o é a massa de óleo (g).

Para determinar o fator de correção da solução de NaOH deve ser realizada a padronização da mesma. A padronização da solução de hidróxido de sódio foi realizada da seguinte maneira: primeiramente, retirou-se a umidade excessiva do biftalato de potássio, deixando o sólido em estufa a 105 °C/1 h; depois de frio, pesou-se rapidamente 0,05 g de biftalato de potássio seco e adicionou-se em 75 mL de água isenta de gás carbônico (água fervida por 3 a 5 minutos e resfriada sem contato com o ar); acrescentou-se à solução 2 gotas de fenolftaleína a 1% e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L a ser padronizada, até o aparecimento de uma solução rósea clara.

O fator de correção é dado por:

$$f = \frac{P}{0,2042 \times V \times M} \quad (2)$$

sendo que:

P é a massa do biftalato de potássio usado na titulação (g);

V é o volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

M é molaridade da solução de hidróxido de sódio (mol/L).

O fator de correção deve estar entre 0,9 a 1,1, caso contrário adiciona-se água ou hidróxido de sódio na solução até atingir-se esse patamar.

III.3.2 Determinação da composição em ácidos graxos do óleo

Para determinar a composição em ácidos graxos presentes no óleo é necessário, primeiramente, realizar a sua derivatização, já que os óleos a serem analisados precisam ser convertidos em componentes de maior volatilidade, tais como os ésteres metílicos (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Devido ao alto índice de acidez apresentado pelo óleo de microalga, utilizou-se a metodologia de esterificação de lipídeos (HARTMANN e LAGO, 1973), descrita a seguir.

Pesaram-se 100 mg de amostra de óleo em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 4 mL de solução 0,5 equivalente/L de NaOH em metanol. Fechou-se bem o tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho de água em ebulição, até dissolver os glóbulos de óleo e a solução tornar-se transparente. Esfriou-se o tubo de ensaio em água corrente e adicionaram 5 mL do reagente esterificante (metanol). O tubo foi novamente aquecido em banho, sendo adicionados 4 mL da solução saturada de cloreto de sódio. Agitou vigorosamente o tubo por 30 segundos e, após, adicionaram-se 5 mL do solvente n-heptano. O tubo foi novamente agitado por mais 30 segundos. Deixou-se o tubo em repouso por aproximadamente 90 minutos, na geladeira. O sobrenadante foi utilizado para análise do óleo por cromatografia em fase gasosa.

III.4 Produção de ésteres

III.4.1 Transesterificação *in situ*

A transesterificação *in situ* foi realizada utilizando a biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* e como catalisador o ácido clorídrico 37%.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo (15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos), temperatura (45, 60, 75 e 90 °C), álcool (metanol e etanol), solvente (n-hexano e clorofórmio) e o uso de agitação (sem agitação e com agitação em banho termostaticado Dubnoff). Cabe ressaltar que todas as reações foram realizadas, pelo menos, em triplicata.

A metodologia utilizada para a transesterificação *in situ* foi determinada pelos resultados obtidos por Baumgärtner (2011) e Baumgärtner et al. (2013c), que se baseou na metodologia proposta por Lewis et al. (2000) para a síntese de ésteres alquílicos via transesterificação ácida *in situ*, a partir de microrganismos heterotróficos.

Para isto, primeiramente, foram pesados 20 mg de biomassa seca dentro de tubos de ensaio de aproximadamente 10 mL, de fundo arredondado e providos de tampa. Em seguida, foram adicionados aos tubos 3 mL de uma solução contendo uma razão álcool:catalisador:solvente de 10:1:1 (v/v/v). A biomassa foi suspensa em banho, em temperatura e tempo pré-determinados.

Depois de decorrido o tempo de reação, o tubo foi retirado do banho e resfriado até atingir temperatura ambiente, em banho com água gelada. Depois de frio, foi adicionado 1 mL de água deionizada com o intuito de inibir a reação e favorecer a separação de fases. Em seguida, foram adicionados 2 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio na razão 4:1 (v/v) para induzir a separação de fases, sendo a fase inferior composta pela biomassa e subprodutos da reação e a fase superior por solvente e os ésteres alquílicos produzidos. Após a separação das fases o sobrenadante foi recolhido em outro tubo. Este procedimento foi repetido por três vezes, para assegurar uma remoção completa dos ésteres formados no meio reacional. Então, o solvente foi evaporado em estufa a 60 °C, por aproximadamente 15 horas, e os ésteres produzidos foram diluídos em uma solução de n-hexano e de éster metílico tricosanóico (C23:0) de concentração conhecida, que foi utilizado como padrão interno (PI). As amostras foram, então, armazenadas a -8 °C, por 24 horas, para posterior identificação e quantificação

dos ésteres produzidos por meio de cromatografia gasosa, baseada no método proposto por Visentainer (2012).

III.4.2 Identificação dos ésteres obtidos

Para isto, fez-se uso de um padrão FAME Mix (*fatty acid methyl ester*) da marca Sigma Aldrich, que consiste em uma amostra contendo 37 diferentes ésteres metílicos, os quais incluem os ésteres contidos no óleo e biodiesel analisados.

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Varian, modelo CP 3800, com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos BP - X70 - SGE de 30 m x 0,25 mm. Como gás de arraste utilizou-se o hélio, numa razão *split* de 1:10. A análise foi realizada com programação de temperatura da coluna, iniciando a 150 °C, com aquecimento até 250 °C a uma taxa de 3 °C/min. A temperatura do detector foi de 220 °C e do injetor de 260 °C.

A partir do cromatograma obtido para as amostras analisadas foi possível identificar, por meio da comparação dos tempos de retenção na coluna com a amostra padrão, os respectivos ésteres etílicos/metílicos presentes na amostra (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

III.4.3 Quantificação do ésteres

Para quantificar os produtos da reação utilizou-se a metodologia de padronização interna, conforme descrita por Visentainer e Franco (2006). Esta metodologia foi escolhida por ser menos sensível a erros de injeções e variações instrumentais, como, por exemplo, o tamanho da amostra injetada, o fluxo do gás de arraste, a temperatura da coluna etc. (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

O padrão interno (PI) utilizado foi o éster metílico tricosanóico 99%, adquirido da Sigma-Aldrich. Este éster foi escolhido como PI por não ter sido identificado como componente da amostra de biodiesel produzido. Além disso, é um composto estável, permite a adição de uma quantidade precisa na amostra e, principalmente, apresenta a resposta próxima aos componentes encontrados no biodiesel produzido (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Para o cálculo da massa de ácidos graxos presentes na amostra é necessário utilizar fatores de correção para os ésteres, em relação ao padrão interno (PI). Existem dois fatores para corrigir esta resposta diferencial do detector, sendo estes o fator de correção experimental ou empírico (FCE), cujo valor é determinado experimentalmente, e o fator de correção teórico (FCT), determinado teoricamente a partir do número de carbonos ativos (C*), ou seja, o número de carbonos ligados a átomos de hidrogênio (C-H).

Os valores do FCT são apresentados por Visentainer (2011) para vários ésteres metílicos de ácidos graxos com diferentes PI.

Além disso, de acordo com Visentainer e Franco (2006), os componentes injetados são ésteres metílicos/etílicos e para convertê-los para ácido graxo é necessário calcular o fator de conversão (FCEA). Porém, para o biodiesel o FCEA é igual a 1, pois o resultado deve ser expresso em éster metílico/etílico de ácidos graxos e não em ácidos graxos (VISENTAINER, 2012).

A partir da determinação destes parâmetros foi possível calcular a massa de ácido graxo na amostra, bem como a massa de éster metílico/etílico. Assim, para o cálculo da massa de ácido graxo na amostra utilizou-se a seguinte relação:

$$M_x = \frac{A_x \times M_p \times F_{CT}}{A_p \times M_A} \quad (3)$$

sendo que:

M_x é a massa do ácido graxo x na amostra analisada de lipídeos totais (mg/g);

M_p é a massa do padrão interno (mg);

M_A é a massa biomassa seca (g);

A_x é a área no cromatograma relativa ao ácido graxo x na amostra analisada;

A_p é a área no cromatograma relativa ao padrão interno na amostra analisada.

Obteve-se, assim, a quantidade de éster produzido por grama de biomassa seca (mg de éster/g biomassa). Visando à discussão dos resultados, a quantidade de ésteres produzidos (mg) por massa de biomassa seca (g) foi denominado de rendimento em ésteres.

Após a obtenção dos resultados foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos com posterior teste de Tukey (*post-hoc*), utilizando o *Software STATISTICA*[®] versão 7.1. As análises foram realizadas com o objetivo de determinar o tempo de reação necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada.

Para isto, os resultados foram divididos em dois grandes grupos, sendo estes ésteres metílicos e ésteres etílicos. O mesmo procedimento foi realizado para as reações com agitação.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Extração e purificação do óleo

Baseado nos resultados obtidos por Baumgärtner (2011) e Baumgärtner et al. (2013b), a extração do óleo da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* foi realizada pelo método de extração (lavagem) sucessiva, conforme descrito no capítulo anterior.

Por meio do método de extração sucessiva, foi possível obter um teor de lipídeos totais de $9,68 \pm 1,14\%$ na biomassa seca da microalga *Scenedesmus sp.*, valor este maior do que $5,14\%$ obtido por Baumgärtner et al. (2013b). Porém, abaixo do valor descrito por Mata et al. (2010) de 19,6 a 21,1%.

Esta diferença entre o valor encontrado e o descrito por Mata et al. (2010), pode ter ocorrido devido ao teor de lipídios totais presentes na biomassa da microalga depender diretamente do meio de cultivo da mesma, além da diferença nos métodos de extração e nas características do solvente.

A extração de lipídeos utilizando solventes orgânicos é o método mais utilizado e está baseada no princípio “semelhante dissolve semelhante”. Logo, a polaridade do solvente utilizado está diretamente ligada à qualidade final dos lipídeos extraídos (D’OCA et al., 2011; LAM e LEE, 2011; HALIM et al., 2012).

Para uma extração eficiente o solvente orgânico deve extrair o máximo de acilglicerídeos, minimizando a coextração de compostos que não são convertidos em biodiesel, como, por exemplo, os lipídeos brutos. Quando a extração é realizada utilizando um solvente apolar, como o n-hexano, o solvente então penetra pela parede celular e interage com os lipídeos neutros. Como resultado, os lipídeos neutros são extraídos com maior eficiência e ficam dissolvidos no solvente (HALIM et al., 2012).

No entanto, alguns lipídeos neutros estão no citoplasma da célula em forma de complexos com lipídeos polares (HALIM et al., 2012). Para a extração destes lipídeos se faz necessário a utilização de solventes polares. Porém, isto leva à coextração de lipídeos polares, ou seja, compostos indesejáveis para a produção de biodiesel (HALIM et al., 2012).

Segundo Baumgärtner et al. (2013b), a extração sucessiva utilizando como solvente o n-hexano se mostrou a mais adequada, pois mesmo obtendo um teor de lipídeos totais inferior ao descrito na literatura, a mesma levou a uma composição em ácidos graxos característico da maioria das oleaginosas utilizadas para a produção de biodiesel, levando a ganhos significativos na qualidade final do biodiesel.

Porém, mesmo quando a extração é realizada utilizando apenas solvente apolar, ainda se faz necessário a purificação do extrato obtido para se determinar a quantidade real de acilglicerídeos presentes na biomassa seca da microalga.

Para realizar a purificação do óleo extraído foi utilizada uma coluna contendo carvão ativado de osso, conforme mostra a Figura IV.1. O objetivo deste processo foi eliminar componentes indesejáveis para a transesterificação, como, por exemplo, pigmentos. Assim, o extrato obtido foi diluído em n-hexano e esta solução foi passada pela coluna recheada com carvão ativado.

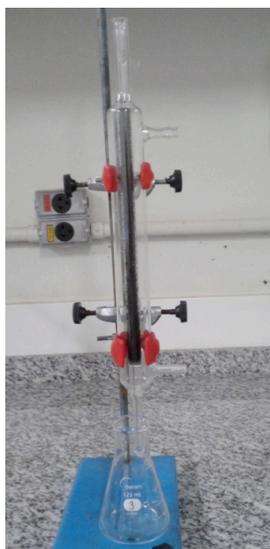


Figura IV. 1 - Coluna recheada com carvão ativado utilizada na purificação do óleo de microalga.

A Figura IV.2 apresenta o extrato, dissolvido em n-hexano, antes e após ser passado pela coluna recheada com carvão ativado. Por meio da mesma pode-se observar claramente a alta eficiência na remoção dos pigmentos do extrato contendo os lipídeos totais.

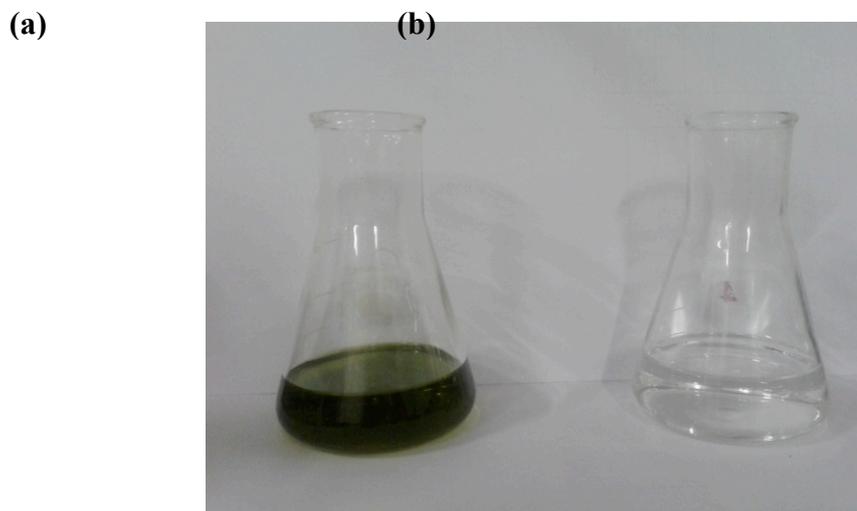


Figura IV. 2 - Extrato diluído em n-hexano: a) antes; e b) após passar pela coluna recheada com carvão ativado.

O solvente n-hexano utilizado para diluir o extrato foi recuperado em um evaporador rotativo e os lipídeos obtidos após a purificação foram secos em estufa a 60 °C, para completa remoção do solvente. Após a purificação dos lipídeos totais foi obtido um teor mássico de lipídeos neutros de $5,19 \pm 0,74\%$.

Com o intuito de verificar a eficiência do processo de purificação foi realizada uma espectroscopia de varredura UV-vis da amostra após a extração, denominada de extrato, e da amostra após a purificação, denominada purificada. Para comparação com as bandas características dos lipídeos neutros foi realizada, também, a análise de uma solução contendo ácido oleico P.A (marca Synth) e outra contendo óleo de soja refinado, ambas dissolvidas em n-hexano, devido à presença predominante de triacilglicerídeos e praticamente ausência de ácidos graxos livres na composição.

Os espectros no UV-vis obtidos são mostrados na Figura IV.3 e as bandas observadas são apresentadas na Tabela IV.1.

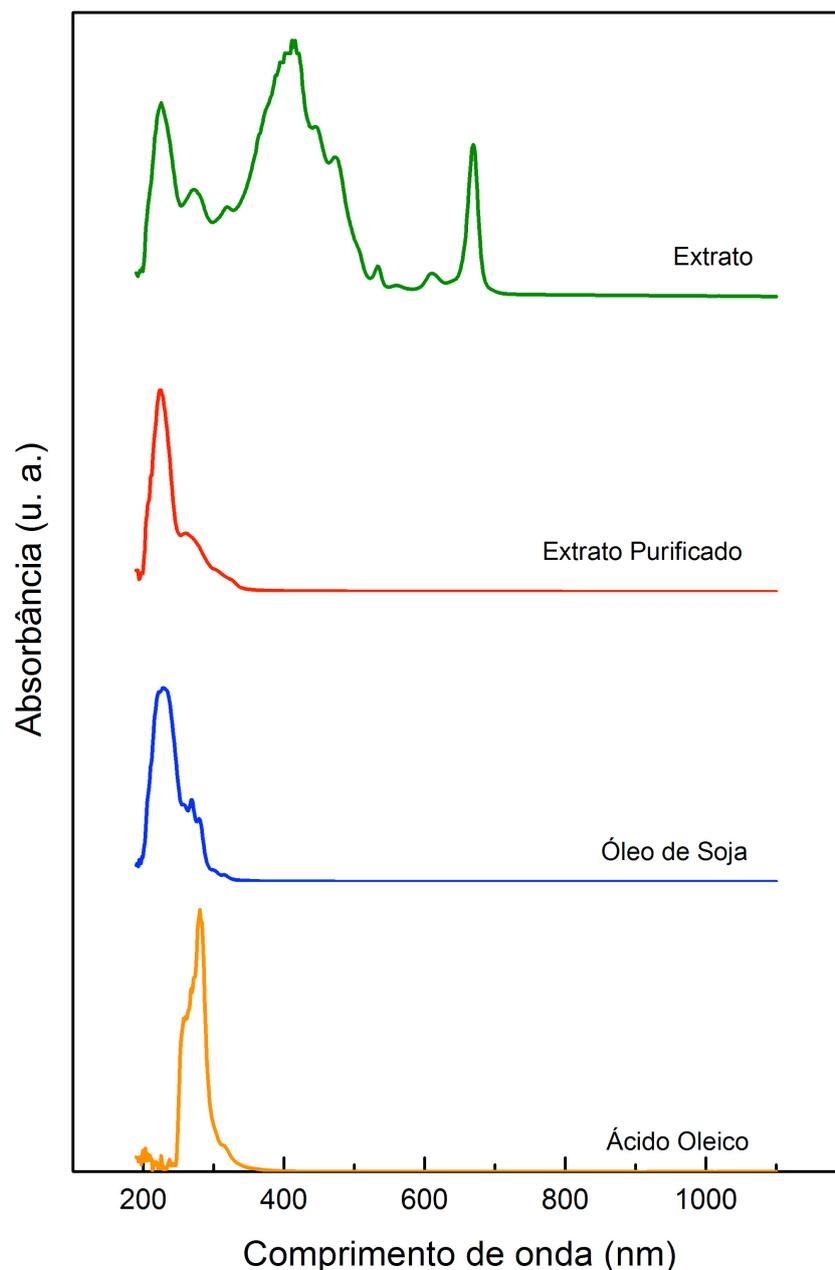


Figura IV. 3– Espectroscopia no UV-vis.

Por meio da Figura IV.3 e da Tabela IV.1 é possível observar a eficiência do processo de purificação, ficando claro o desaparecimento das bandas características da clorofila *a* e dos carotenos. A presença predominante de triacilglicerídeos na amostra purificada é confirmada pela comparação com os espectros obtidos para o óleo de soja refinado, o qual apresenta apenas bandas intensas em 229 e 269 nm, e para o ácido oleico com banda intensa em 270 nm, ambas atribuídas aos lipídeos, que são predominantemente triacilglicerídeos para o óleo comercial.

Tabela IV. 1 – Comprimento de onda das bandas principais observadas nos espectros no UV-vis.

Banda característica	Comprimento de onda (nm)			
	Extrato	Purificada	Óleo de soja	Ácido oleico
Lipídeos	225	223	229	-
Lipídeos	272	261	269	270
Clorofila <i>a</i> *	411	-		
Caroteno*	473	-		
Clorofila <i>a</i> *	533	-		
Clorofila <i>a</i> *	611	-		
Clorofila <i>a</i> *	669	-		

*Maestrin et al. (2009).

IV.2 Caracterização do óleo

O produto obtido por meio da purificação em coluna de leito fixo foi utilizado para determinação do índice de acidez e composição em ácidos graxos do óleo da microalga.

IV.2.1 Índice de acidez

O índice de acidez do óleo da microalga foi obtido para determinar qual a rota catalítica mais adequada para a reação de transesterificação *in situ*. O índice de acidez obtido foi de 6,89 mg KOH/g.

Mesmo com esta tolerância, a acidez dos lipídeos purificados obtida da biomassa seca da microalga *Scenedesmus sp.* indica que o melhor processo para produção de ésteres é a via ácida, podendo ser utilizado ácido clorídrico, como descrito na metodologia de Lewis et al. (2000).

IV.2.2 Composição em ácidos graxos

Para a produção de um biodiesel de qualidade segundo, a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), a composição em ácidos graxos e o conteúdo lipídico devem ser considerados. Características como índice de iodo, número de cetano,

saponificação e ponto de entupimento de filtro a frio são influenciadas pelo grau de insaturação dos ácidos graxos (NASCIMENTO et al., 2013).

A partir da composição em ácidos graxos da microalga *Scenedesmus sp.* apresentado na Tabela IV.2, pode-se observar que 33,62% dos ácidos graxos presentes são saturados, 43,93% monoinsaturados e 22,45% poliinsaturados. Este perfil obtido é semelhante ao encontrado por Baumgärtner et al. (2013b) para a mesma microalga (*Scenedesmus accuminatus*), sendo este composto de 33,18% de ácidos graxos saturados, 26,22% monoinsaturados e 40,60% poliinsaturados. Já segundo Nascimento et al. (2013), a composição em ácidos graxos obtidos a partir da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* é composto de 70,83% de ácidos graxos saturados, 21,71% monoinsaturados e 7,46% poliinsaturados.

A composição em ácidos graxos do óleo da microalga é apresentado na Tabela IV.2.

Tabela IV. 2 – Composição em ácidos graxos do óleo purificado da microalga *Scenedesmus sp.*

Ácido Graxo	% (m/m)	Ácido Graxo	% (m/m)
C8:0	2,833	C17:0	0,8101
C10:0	7,151	C18:0	2,334
C11:0	0,6207	C18:1	38,15
C13:0	0,8844	C18:2	16,56
C14:0	0,9887	C18:3	3,085
C14:1	0,9469	C20:0	0,9123
C15:0	1,068	C20:1	2,857
C15:1	0,4561	C21:0	0,4456
C16:0	14,83	C22:0	0,7424
C16:1	1,518	C20:3	2,807

Observa-se também pela Tabela IV.2 que as maiores proporções de ácidos graxos extraídos, aproximadamente 70%, foram de C18:1, C18:2 e C16:0 (em ordem decrescente), com a predominância de ácidos graxos insaturados. Este perfil leva a ganhos na propriedade ponto de entupimento do filtro a frio, pois o ponto de fusão dos ácidos graxos saturados é maior que o ponto de fusão dos ácidos graxos insaturados. Portanto, quando um biodiesel rico em ácidos graxos saturados é resfriado, estes ácidos

graxos são os primeiros a se precipitar (NASCIMENTO et al., 2013), não sendo adequados para o uso em regiões de clima frio. Por outro lado, a presença de ácidos graxos insaturados, principalmente os ácidos graxos com mais de 4 insaturações, pode levar a perdas na estabilidade à oxidação e, portanto, na diminuição do tempo de armazenamento em tanque.

Observa-se, também, a presença de aproximadamente 10% de ácidos graxos menores que C11:0 que pode afetar negativamente o ponto de fulgor, mas positivamente a viscosidade. Por outro lado, há mais de 7,5% de ácidos graxos maiores que C20:0 que podem afetar negativamente a viscosidade, mas positivamente o ponto de fulgor. Para Nascimento et al. (2013) nenhuma espécie possui todas as características ideais para a produção de biodiesel, no entanto, muitas possuem as características principais. Logo, os autores sugerem que um biodiesel de qualidade pode ser obtido por meio da mistura de espécies de microalgas.

Ressalta-se, também, que os ácidos graxos predominantes obtidos a partir da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* é igual aos principais ácidos graxos presentes no óleo de soja, principal matéria-prima utilizada na produção de biodiesel atualmente no Brasil (RAMOS et al., 2009; LEUNG et al., 2010), levando a ganhos na qualidade final do biodiesel.

IV.3 Transesterificação *in situ*

A transesterificação *in situ* da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* foi realizada utilizando metanol e etanol.

Após a obtenção dos rendimentos em ésteres foi realizada uma análise de variância, com posterior teste de médias (*post-hoc*) por meio do *Software STATISTICA*[®], para determinação das condições ótimas de reação *in situ*.

IV.3.1 Obtenção de ésteres metílicos

As Figuras IV.4 e IV.5 mostram o rendimento em ésteres metílicos obtidos em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando os solventes n-hexano e clorofórmio, respectivamente.

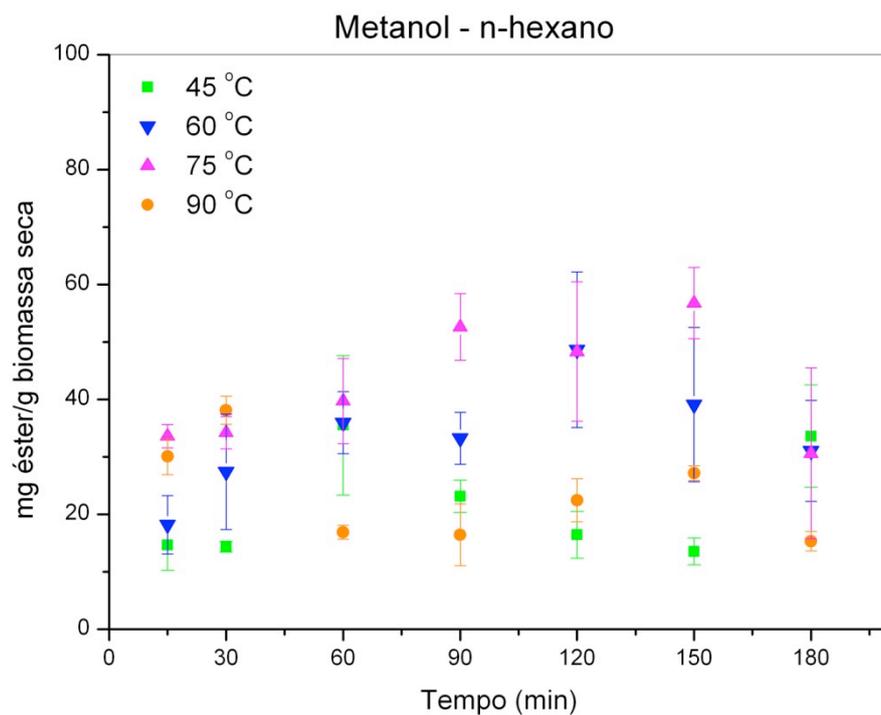


Figura IV. 4—Rendimento em ésteres metílicos obtido na reação *in situ* em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente n-hexano.

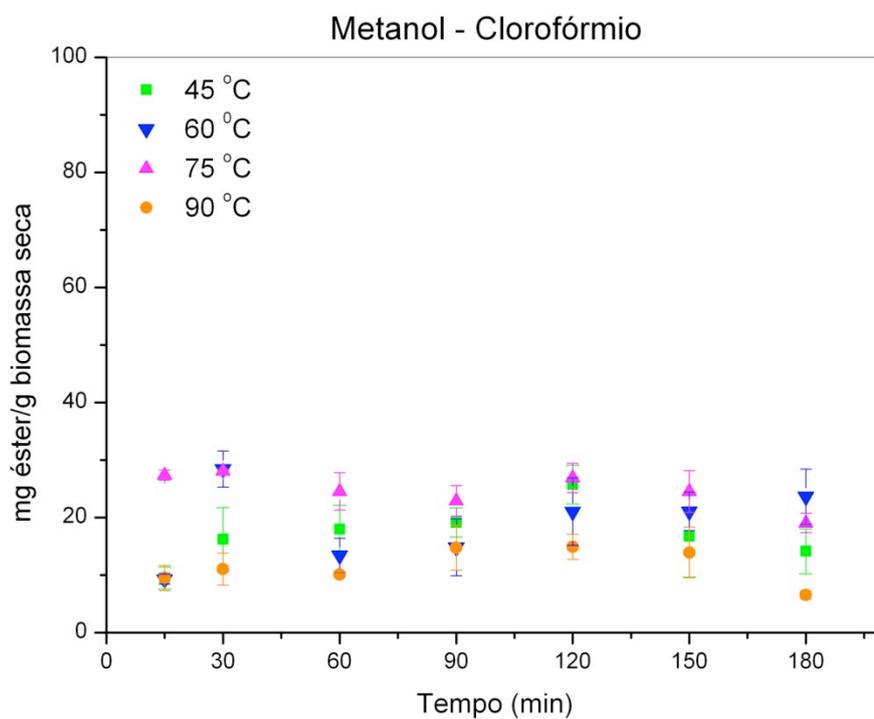


Figura IV. 5 – Rendimento em ésteres metílicos obtido na reação *in situ* em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente clorofórmio.

Por meio das Figuras IV.4 e IV.5 foi possível observar que as reações realizadas utilizando o solvente n-hexano levaram a valores de rendimento em ésteres mais altos, porém, com desvio padrão maiores.

Observa-se, também, que o uso de temperaturas mais elevadas, como por exemplo, 90 °C não resultou em um aumento significativo no rendimento em ésteres, em relação a temperaturas menores. Quando foi utilizado o solvente n-hexano o rendimento em ésteres máximo foi atingindo nos primeiros 30 minutos de reação, porém, em seguida há uma queda. Já para o solvente clorofórmio o rendimento em ésteres foi praticamente constante e com valores mais baixos. Este fato pode estar relacionado à volatilidade dos reagentes nesta temperatura (BAUMGÄRTNER, 2011).

Os problemas relacionados à volatilidade dos reagentes foram observados nas reações realizadas a 75 °C e, principalmente, a 90 °C. Isto está diretamente relacionado ao fato de a reação não ocorrer em um sistema completamente fechado, ou seja, capaz de impedir a evaporação dos reagentes, por menor que esta seja e, então, manter a condição de equilíbrio no sistema.

Outra hipótese a ser considerada para este problema pode estar relacionado ao fato dos reagentes nestas temperaturas, em sua maioria, estarem na fase vapor não entrando em contato com a biomassa tempo suficiente para promover a reação e levar a um aumento no rendimento em ésteres, como observado por Baumgärtner (2011).

Pode-se observar pelas curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.4 que a velocidade da reação aumenta com o aumento da temperatura, sendo maior para as reações realizadas a 75 e 90 °C. Nota-se, também, que ocorre uma queda no rendimento em ésteres nas reações realizadas a 45 e 90 °C sendo esta última mais acentuada. A queda no rendimento em ésteres pode estar relacionada a uma perda de ésteres produzidos devido à emulsificação do meio pela maior presença de mono e di-acilglicerídeos resultantes de uma diminuição da velocidade de reação, que por sua vez pode ser consequência de uma fração maior de reagentes na fase gasosa e menor contato destes com a biomassa.

Já por meio das curvas apresentadas na Figura IV.5, observa-se que a velocidade da reação é maior nas reações realizadas a 60 e 75 °C e que as curvas cinéticas tendem a permanecer constante após os primeiros 30 minutos de reação, mostrando uma tendência ao equilíbrio, exceto para a temperatura de 60 °C, devido a emulsificação do meio, como já discutido anteriormente.

Com o objetivo de determinar o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o tempo de reação, com posterior teste de médias (*post-hoc*), para os solventes n-hexano e clorofórmio.

Nas reações realizadas com metanol, a análise de variância revelou que o tempo de reação tem influência significativa no rendimento em ésteres, independente da temperatura e do solvente utilizado, confirmando o que já pôde ser observado por meio das Figuras IV.4 e IV.5. Assim, a partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ* foi possível determinar o tempo de reação necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, conforme apresentado na Tabela IV.3.

Tabela IV. 3 – Rendimento máximo em ésteres metílicos em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)			
	n-hexano	Tempo (min)	Clorofórmio	Tempo (min)
45	35,51	60	16,20	30
60	35,92	60	28,42	30
75	33,58	15	27,35	15
90	38,07	30	9,488	15

Observa-se por meio da Tabela IV.3 que quando se utilizou o solvente n-hexano os rendimentos máximos em ésteres obtidos mostraram uma distribuição de valores homogênea para as diferentes temperaturas estudadas, estando entre 33,58 e 38,07 mg ésteres/g biomassa seca. Já quando as reações foram realizadas utilizando o solvente clorofórmio esta distribuição apresentou uma variação significativa nos valores de rendimento máximo em ésteres, na faixa de 9,488 a 28,42 mg ésteres/g biomassa seca.

Logo, para atingir rendimento máximo em ésteres metílicos existem seis possíveis combinações que podem ser utilizadas, sendo quatro para o solvente n-hexano e duas para o solvente clorofórmio, conforme está destacado na Tabela IV.3.

Observa-se, também, que quando foi utilizado o solvente n-hexano o rendimento máximo em ésteres não aumentou com o aumento da temperatura. Já para o

solvente clorofórmio os maiores valores de rendimento máximo em ésteres, foram obtidos nas temperaturas de 60 e 75 °C, mostrando-se, então, as mais adequadas.

O fato da temperatura não influenciar no rendimento máximo em ésteres metílicos pode estar relacionado ao uso dos solventes n-hexano e clorofórmio na reação. Segundo Xu e Mi (2011), o solvente é fundamental para o processo, pois contribui para a formação de um sistema homogêneo entre o óleo da biomassa, o álcool e o catalisador levando a melhores rendimentos em ésteres a temperaturas mais baixas. De fato, neste trabalho o clorofórmio e o n-hexano podem ter atuado no sistema como cosolventes, justificando os valores de rendimento em ésteres metílicos obtidos em temperaturas não tão altas como 45 e 60 °C.

Baumgärtner (2011) realizou a transesterificação *in situ* da microalga *Scenedesmus sp.*, utilizando a mesma metodologia deste estudo. Os maiores valores de rendimentos obtidos foram 66,39 e 60,70 mg éster/g biomassa seca para as reações realizadas a 60 °C, com solvente clorofórmio a 60 minutos e n-hexano a 30 minutos de reação, respectivamente. Os rendimentos obtidos por Baumgärtner (2011) foram superiores ao obtido neste trabalho, tal fato pode ser explicado pela diferença na composição de lipídeos presentes na microalga.

Observa-se que o tempo necessário para atingir o rendimento máximo, independente do solvente utilizado, não foi superior a 60 minutos, concordando, neste caso, com os dados obtidos por Baumgärtner (2011).

Em temperaturas mais altas o rendimento máximo em ésteres foi obtido em tempos menores (15 a 30 min). Isto porque temperaturas elevadas aumentam a miscibilidade inicial dos reagentes, levando à redução no tempo de reação (EHIMEN et al., 2010).

Conforme já descrito na metodologia, todas as reações foram realizadas com e sem o uso de agitação. Em geral, a agitação tem sido utilizada no processo de transesterificação *in situ* com intuito de aumentar o rendimento em ésteres e como estratégia de redução de gastos com aquecimento e tempo (EHIMEN et al., 2010; STAMENKOVIC et al., 2011).

A Figura IV.6 apresenta os valores de rendimento em ésteres metílicos obtidos com e sem o uso da agitação, utilizando o solvente n-hexano em diferentes temperaturas.

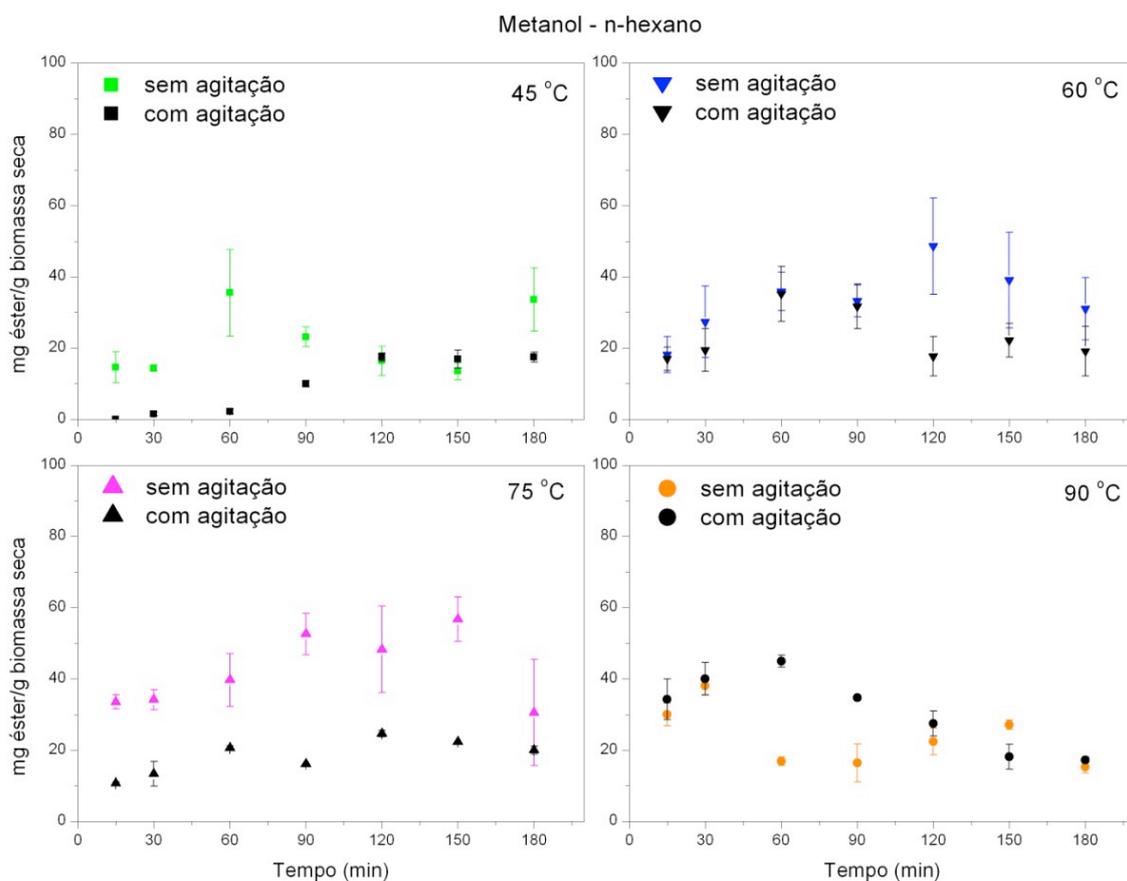


Figura IV. 6—Rendimento em ésteres metílicos em função do tempo, para diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente n-hexano.

Por meio das curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.6, observa-se que as reações com agitação, realizadas a 45 e 75 °C, possuem uma velocidade de reação menor do que a observada nas reações sem agitação. Já a 60 e 90 °C as velocidades são semelhantes. Observa-se também, que na temperatura de 45 °C a velocidade da reação com agitação é baixa, já para as demais temperaturas ela tende a aumentar. Sendo maiores nas temperaturas de 60 e 90 °C, no entanto, após 60 minutos de reação ocorre uma queda brusca no rendimento em ésteres. As quedas no rendimento em ésteres podem estar relacionadas aos problemas de perda de ésteres produzidos devido a emulsificação do meio pela maior presença de mono e di-acilglicerídeos resultantes de uma diminuição da velocidade de reação, que por sua vez pode ser consequência de uma fração maior de reagentes na fase gasosa e menor contato destes com a biomassa, como já discutido anteriormente.

Logo, quando se comparam as curvas cinéticas das reações com e sem agitação, apresentadas na Figura IV.6, observa-se que a agitação não exerceu o papel

esperado no aumento do rendimento em ésteres. Esta apenas manteve os valores próximos quando realizadas a 60 e 90 °C, ou menores quando realizadas a 45 e 75°C, o que indica que este parâmetro é menos significativo para o processo.

Com o intuito de verificar a influência do tempo, nas reações com agitação, no rendimento em ésteres metílicos para cada temperatura, primeiramente, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o tempo de reação, com posterior teste de médias (*post-hoc*), para o solvente n-hexano.

Nas reações realizadas com metanol e n-hexano, com agitação, a análise de variância revelou que o tempo de reação influencia significativamente no rendimento em ésteres, independente da temperatura utilizada, confirmando o que já pôde ser observado por meio da Figura IV.6. Assim, a partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ* foi possível determinar o tempo de reação necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, conforme apresentado na Tabela IV.4.

Tabela IV. 4 - Rendimento máximo em ésteres metílicos, das reações *in situ* realizadas utilizando o solvente n-hexano, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)			
	Sem agitação		Com agitação	
	n-hexano	Tempo (min)	n-hexano	Tempo (min)
45	35,51	60	17,47	120
60	35,92	60	35,25	60
75	33,58	15	20,60	60
90	38,07	30	40,08	30

Assim como foi observado pelas curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.6, observa-se, também, pela Tabela IV.4 que a agitação não exerceu o papel esperado no aumento do rendimento em ésteres e na diminuição do tempo de reação. Os maiores rendimentos em ésteres obtidos nas reações com agitação utilizando o solvente n-hexano foram 35,25 mg ésteres/g biomassa seca a 60 °C, durante 60 minutos, e 40,08 mg de ésteres/g biomassa seca a 90 °C, durante 30 minutos. Observa-se, também, que os valores de rendimentos em ésteres das reações realizadas com agitação apresentaram

uma distribuição mais larga variando de 17,47 a 40,08 mg ésteres/g biomassa seca, diferentemente do obtido nas reações sem agitação, como já discutido anteriormente.

Conforme está destacado na Tabela IV.4, existem seis combinações possíveis que podem levar a um rendimento mais alto em ésteres quando se utiliza o solvente n-hexano, independente do uso ou não de agitação. Embora estes rendimentos máximos em ésteres apresentem valores numericamente diferentes, a variação entre eles é pequena. Portanto, por mais que o rendimento máximo em ésteres utilizando agitação tenha sido maior, o mesmo necessitou de uma temperatura elevada para ser alcançado, 90 °C, o que pode acarretar aumento significativo de gastos com energia no processo. Neste caso, evitar gastos com aquecimento e agitação podem ser os fatores para a escolha da melhor condição de reação. Tendo isto como critério, então, a melhor condição quando se utiliza o solvente n-hexano, seria utilizar a temperatura de 45 °C, durante 60 minutos de reação, sem agitação.

Já a Figura IV.7 apresenta os gráficos de rendimento em ésteres metílicos com e sem o uso da agitação, utilizando o solvente clorofórmio, em diferentes temperaturas.

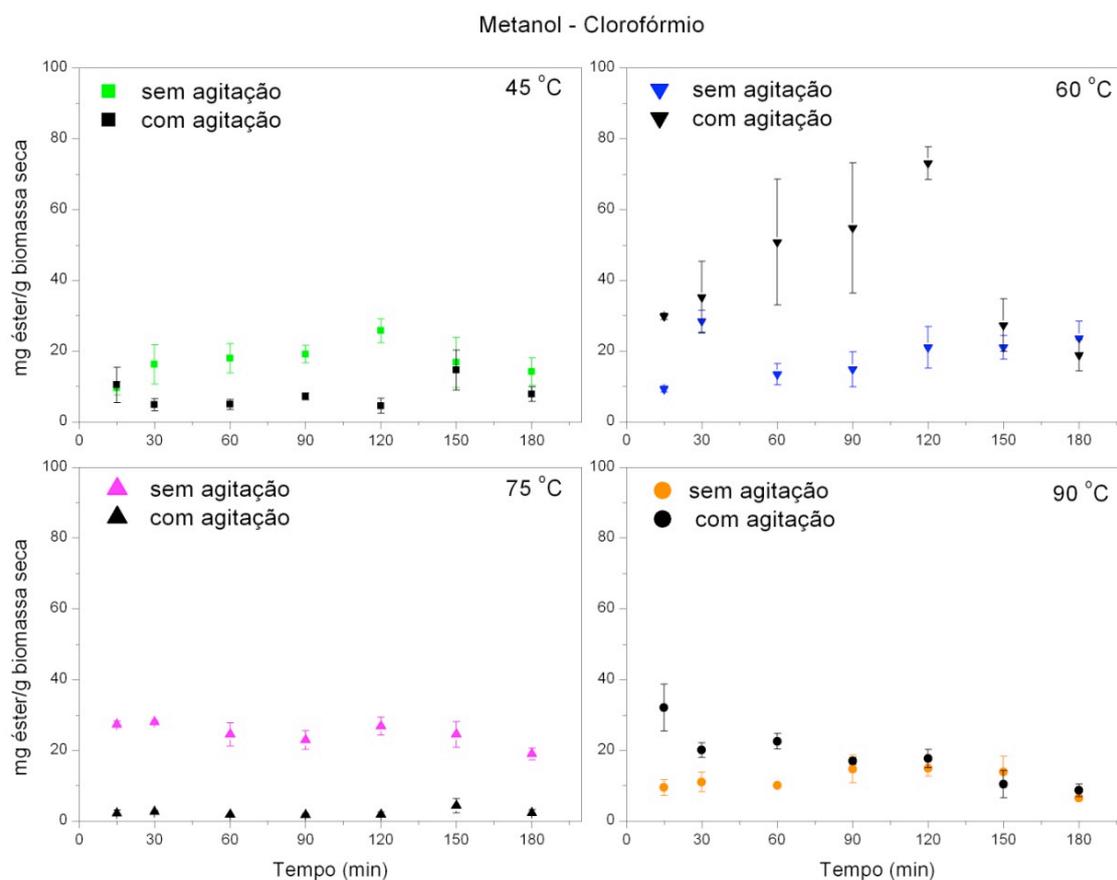


Figura IV. 7–Rendimento em ésteres metílicos em função do tempo em diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente clorofórmio.

Observa-se pelas curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.7 que as reações com agitação, realizadas nas temperaturas de 45 e 75 °C, apresentaram uma velocidade de reação menor do que a observada nas reações sem agitação. Porém, a agitação levou a velocidades de reação maiores nas reações realizadas nas temperaturas de 60 e 90 °C. Comportamento semelhante a este foi observado nas reações com agitação utilizando o solvente n-hexano.

Com o intuito de verificar a influência do tempo, nas reações com agitação, sobre o rendimento em ésteres metílicos para cada temperatura, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), com posterior teste de médias (*post-hoc*), para o solvente clorofórmio.

Nas reações realizadas com metanol e clorofórmio, com agitação, a análise de variância revelou que o tempo de reação influencia significativamente no rendimento em ésteres, exceto para a temperatura de 75 °C, confirmando o que já pôde ser observado por meio da Figura IV.7. Assim, a partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ* foi possível determinar o tempo de reação necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, conforme apresentado na Tabela IV.5.

Tabela IV. 5 - Rendimento máximo em ésteres metílicos, nas reações *in situ* realizadas utilizando o solvente clorofórmio, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)			
	Sem agitação		Com agitação	
	Clorofórmio	Tempo (min)	Clorofórmio	Tempo (min)
45	16,20	30	10,41	15
60	28,42	30	73,12	120
75	27,35	15	2,27	15
90	9,488	15	32,10	15

Observa-se pela Tabela IV.5 que quando foi utilizado o solvente clorofórmio a agitação trouxe um aumento significativo no rendimento em ésteres apenas para as reações realizadas a 60 e 90 °C, como pôde ser observado por meio das curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.7. Os rendimentos máximos em ésteres obtidos por meio das reações com agitação apresentaram uma distribuição larga, na faixa de 2,27 a 73,12 mg

ésteres/g biomassa seca. Já nas reações sem agitação esta distribuição diminuiu significativamente, com valores entre 9,488 e 28,42 mg ésteres/g biomassa seca. Logo, o maior rendimento em ésteres obtido foi de 73,12 mg ésteres/g biomassa seca a 60 °C, durante 120 minutos, com agitação.

Dentre todos os rendimentos máximos em ésteres metílicos obtidos, a reação realizada com o solvente clorofórmio a 60 °C, durante 120 minutos, com agitação ganhou destaque com um rendimento máximo de 73,12 mg ésteres/g biomassa seca. Valor este semelhante ao obtido por Baumgärtner (2011), nas reações com metanol e clorofórmio de 66,39 mg ésteres/g biomassa seca a 60 °C, durante 60 minutos de reação, sem agitação.

IV.3.2 Obtenção de ésteres etílicos

As Figuras IV.8 e IV.9 mostram o rendimento em ésteres etílicos obtidos em função do tempo, em diferentes temperaturas, utilizando o solvente n-hexano e clorofórmio, respectivamente.

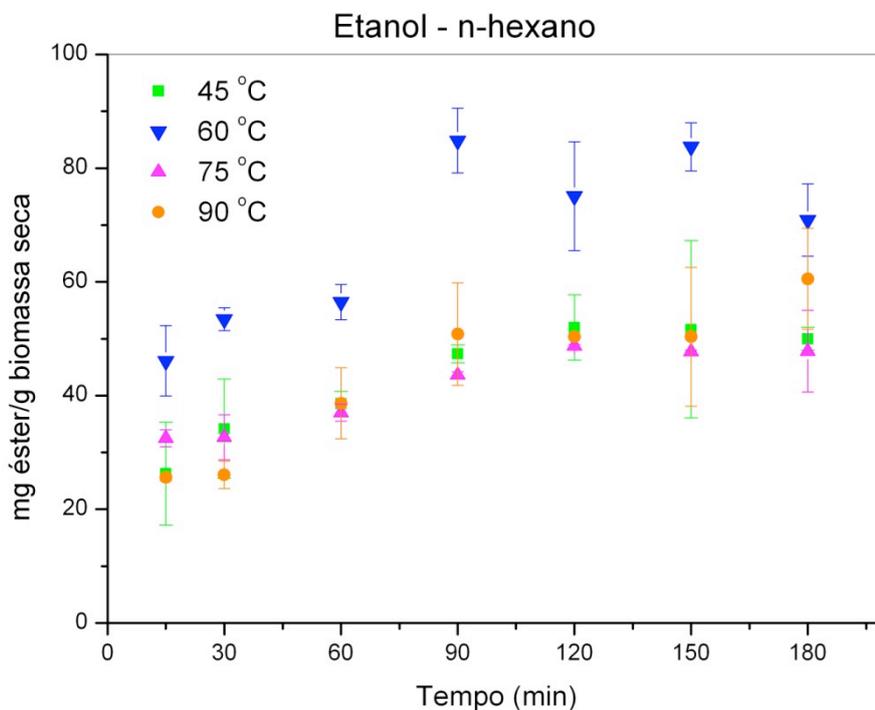


Figura IV. 8 – Rendimento em ésteres etílicos obtido na reação *in situ*, em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente n-hexano.

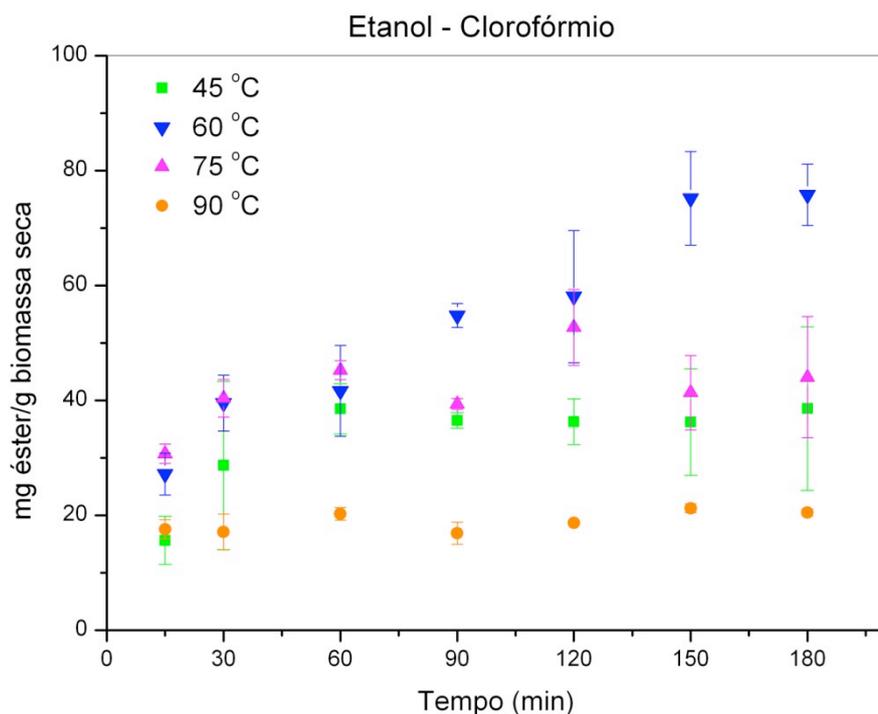


Figura IV. 9—Rendimento em ésteres etílicos obtido na reação *in situ*, em função do tempo, para diferentes temperaturas, utilizando o solvente clorofórmio.

Por meio das reações *in situ*, observou-se que, independente do solvente utilizado, os maiores valores de rendimentos em ésteres etílicos foram obtidos na temperatura de 60 °C. Os rendimentos em ésteres obtidos nas demais temperaturas apresentaram valores menores.

Para as temperaturas de 75 e 90 °C esperava-se obter valores mais altos de rendimentos em ésteres etílicos. Isto porque, de acordo com Ehimen et al. (2010), conversões maiores são encontradas quando são utilizadas temperaturas de reação mais altas que o ponto de ebulição dos reagentes da reação. Porém, este comportamento não foi aqui observado e uma hipótese que pode ser utilizada para explicar. Isto pode estar relacionado ao fato de que nesta temperatura os reagentes, em sua maioria, estão na fase vapor não entrando em contato com a biomassa tempo suficiente para promover a reação e levar a um aumento no rendimento em ésteres. Além disso, o fato de que a reação não ocorre em um sistema completamente fechado, ou seja, capaz de manter a condição de equilíbrio no sistema utilizado para estas reações, como já discutido para as reações *in situ* utilizando metanol.

Cabe destacar que, segundo Xu e Mi (2011) melhores rendimentos a temperaturas mais baixas podem ser alcançados com a utilização de um cosolvente

durante a transesterificação *in situ*, neste caso, o clorofórmio ou n-hexano. Ainda, segundo estes autores, o mesmo é fundamental para o processo, pois contribui para a formação de um sistema homogêneo entre o óleo da biomassa, o álcool e o catalisador. De fato, neste trabalho o clorofórmio e o n-hexano, como já discutido anteriormente para os sistemas com metanol, podem ter atuado no sistema como cosolventes, justificando os valores de rendimento em ésteres etílicos obtidos em temperatura não tão alta de 60 °C, não sendo esta maior do que a temperatura de ebulição dos reagentes, como proposto por Ehimen et al. (2010).

Observa-se pelas curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.8 que a velocidade da reação é maior na reação realizada a 60 °C e nas demais temperaturas as velocidades de reação são semelhantes. Nota-se que, após 90 minutos de reação, as curvas cinéticas tendem a permanecer constantes, mostrando uma tendência ao equilíbrio, diferentemente do que ocorreu nas reações realizadas com metanol e n-hexano, as quais apresentaram oscilações nas curvas cinéticas.

Já por meio das curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.9, observa-se que a velocidade de reação é maior nas reações realizadas a 60 e 75 °C, assim como foi observado nas reações utilizando metanol e clorofórmio, e que a velocidade de reação a 90 °C é a menor entre todas as temperaturas estudadas. Isto pode estar relacionado ao fato de que nesta temperatura os reagentes, em sua maioria, estão na fase vapor não entrando em contato com a biomassa tempo suficiente para promover a reação e levar a um aumento no rendimento em ésteres, como já discutido anteriormente. Após 60 minutos de reação as curvas cinéticas tendem a permanecer constantes, mostrando uma tendência ao equilíbrio, semelhante ao observado nas reações realizadas com metanol e clorofórmio, no entanto, com valores de rendimento em ésteres mais alto.

Novamente, com o objetivo de determinar o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o tempo de reação, com posterior teste de médias (*post-hoc*), para os solventes n-hexano e clorofórmio.

Assim como nas reações realizadas com metanol, a análise de variância revelou que o tempo de reação influencia significativamente no rendimento em ésteres etílicos, independente da temperatura e do solvente utilizado, confirmando o que já pôde ser observado por meio das Figuras IV.8 e IV.9. Assim, a partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ* foi possível determinar o tempo de reação

necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, conforme apresentado na Tabela IV.6.

Tabela IV. 6 – Rendimento máximo em ésteres etílicos em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)			
	n-hexano	Tempo (min)	Clorofórmio	Tempo (min)
45	34,17	30	15,61	15
60	84,84	90	75,17	150
75	43,64	90	40,37	30
90	38,63	60	17,54	15

Por meio da Tabela IV.6 observa-se que os valores de rendimento máximo em ésteres, nas diferentes temperaturas estudadas, apresentaram uma distribuição mais larga, independente do solvente utilizado. Quando foi utilizado o solvente n-hexano os rendimentos máximos em ésteres variaram de 34,17 a 84,84 mg ésteres/g biomassa seca. Já quando foi utilizado o solvente clorofórmio os valores de rendimento máximo em ésteres obtidos foram menores e ficaram entre 15,61 a 75,17 mg ésteres/g biomassa seca. Cabe destacar que os maiores rendimentos foram obtidos na temperatura de 60 °C, independente do solvente utilizado.

Os melhores rendimentos em ésteres etílicos obtidos foram de 84,84 e 75,17 mg ésteres/g biomassa seca, quando a transesterificação *in situ* foi realizada utilizando o solvente n-hexano e clorofórmio, durante 90 e 150 minutos de reação, respectivamente, ambos na temperatura de 60 °C. Embora suas médias apresentem valores numericamente diferentes, ambas combinações podem ser indicadas para a produção de ésteres. Neste caso, a disponibilidade do solvente e o tempo para atingir o rendimento máximo em ésteres pode ser os fatores para a escolha do solvente a ser utilizado. Tomando isto como critério, então, a melhor combinação para realizar a reação seria a utilização do solvente n-hexano, na temperatura de 60 °C, durante 90 minutos de reação.

Observa-se, também, pela Tabela IV.6 que os rendimentos em ésteres mais altos foram obtidos nas temperaturas de 60 e 75 °C. Isto pode estar relacionado ao fato de que estas temperaturas não são muito maiores que ponto de ebulição dos reagentes, conseqüentemente, pode-se evitar problemas com a volatilidade e, assim, proporcionar o contato maior dos reagentes com a biomassa, com tempo suficiente para promover a

reação e levar a um aumento no rendimento em ésteres, como já discutido anteriormente.

O tempo utilizado para obtenção dos maiores rendimentos em ésteres foi menor do que o descrito na literatura para reações catalisadas por um ácido. Ehimen et al. (2010) e Velasquez-Orta et al. (2012) também estudaram a transesterificação *in situ* de microalgas para a produção de biodiesel. Ehimen et al. (2010) obtiveram rendimento máximo em ésteres após 240 minutos de reação, quando as mesmas foram realizadas a 60 °C, utilizando ácido sulfúrico como catalisador. Já Velasquez-Orta et al. (2012) obtiveram rendimento máximo em 75 minutos de reação, utilizando hidróxido de sódio como catalisador.

Baumgärtner (2011) realizou a transesterificação *in situ* da microalga *Scenedesmus sp.*, utilizando a mesma metodologia deste estudo. Os maiores valores de rendimentos em ésteres etílicos obtidos foram 67,04 mg ésteres/g biomassa seca, em 120 minutos de reação, utilizando clorofórmio, e 61,79 mg ésteres/g biomassa seca, em 60 minutos de reação, com o solvente n-hexano, ambas realizadas a 60 °C. O tempo máximo estudado por Baumgärtner (2011) foi de 120 minutos. Assim, os dados obtidos indicam que rendimento em ésteres mais alto pode ser obtido por meio de reações realizadas em tempos mais longos para o solvente clorofórmio.

Conforme já descrito na metodologia, todas as reações foram realizadas com e sem o uso de agitação, com o objetivo de aumentar o rendimento em ésteres e como estratégia de redução de gastos com aquecimento e tempo.

A Figura IV.10 apresenta o rendimento em ésteres etílicos em função do tempo, com e sem o uso da agitação, em diferentes temperaturas, utilizando o solvente n-hexano.

A partir das curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.10, observa-se que as reações com agitação apresentaram um comportamento semelhante ao observado para as reações sem agitação, porém, a velocidade de reação foi menor nas temperaturas de 45 e 75°C e semelhantes nas temperaturas de 60 e 90 °C. Observa-se, também, que as curvas cinéticas tendem a permanecer constantes após 60 minutos, mostrando uma tendência ao equilíbrio. Comportamento semelhante também foi observado para as reações realizadas com metanol.

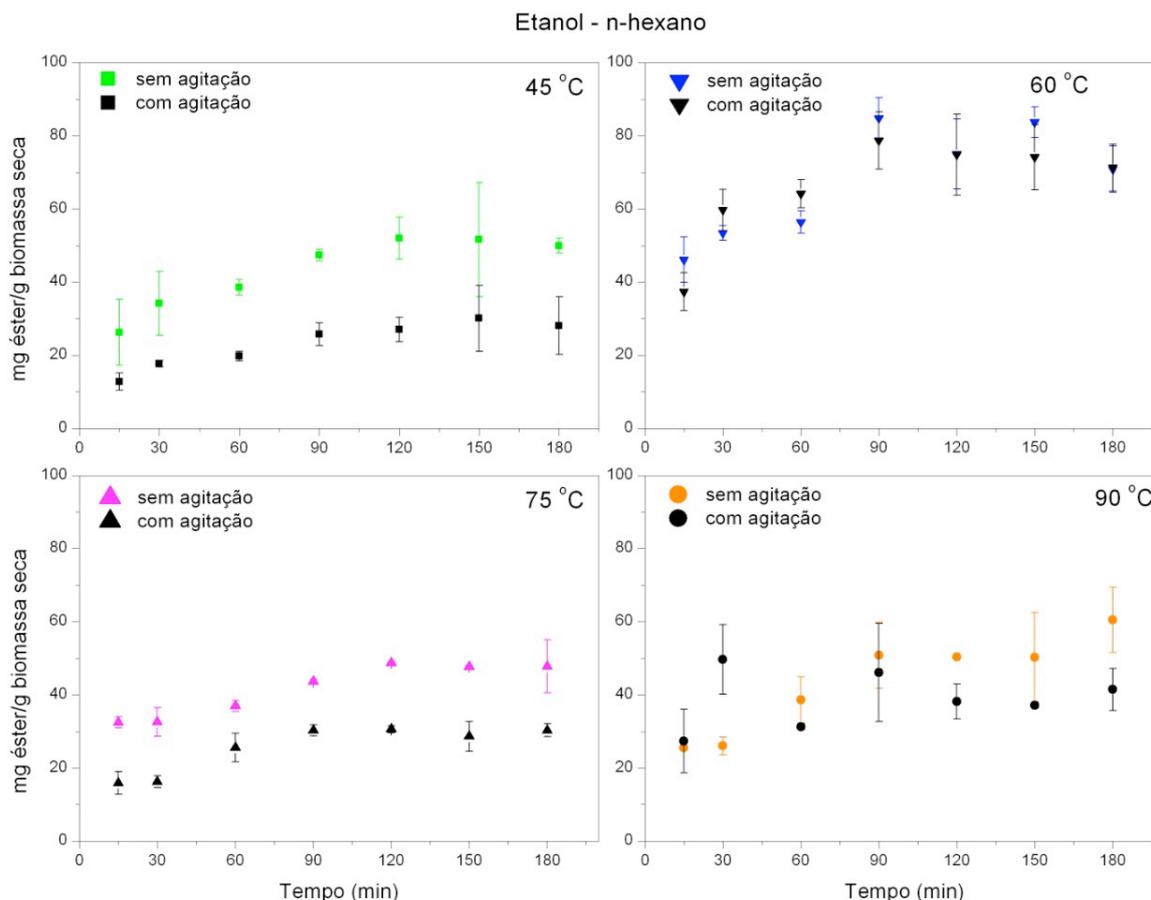


Figura IV. 10 – Rendimento em ésteres etílicos em função do tempo, em diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente n-hexano.

Novamente, com o intuito de verificar a influência do tempo, nas reações com agitação, no rendimento em ésteres etílicos para cada temperatura, primeiramente, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o tempo de reação, com posterior teste de médias (*post-hoc*), para o solvente n-hexano.

Nas reações realizadas com etanol e n-hexano, com agitação, a análise de variância revelou que o tempo de reação influencia significativamente no rendimento em ésteres, independente da temperatura utilizada, confirmando o que já pôde ser observado por meio da Figura IV.10. Assim, a partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ* foi possível determinar o tempo de reação necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, conforme apresentado na Tabela IV.7.

Tabela IV. 7 – Rendimento máximo em ésteres etílicos, para as reações *in situ* realizadas utilizando o solvente n-hexano, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)			
	Sem agitação		Com agitação	
	n-hexano	Tempo (min)	n-hexano	Tempo (min)
45	34,17	30	17,74	30
60	84,84	90	64,17	60
75	43,64	90	25,60	60
90	38,63	60	49,72	30

Observa-se pela Tabela IV.7 que os rendimentos máximo em ésteres obtidos nas reações realizadas com agitação são menores do que os obtidos nas reações sem agitação realizadas a 45 e 75 °C e semelhantes nas reações realizadas a 60 e 90 °C, como também pôde ser observado pelas curvas cinéticas. O rendimento máximo em ésteres obtido na reação com agitação foi de 64,17 mg ésteres/g biomassa seca para a temperatura de 60 °C durante 60 minutos.

Nota-se que a agitação não influenciou da forma esperada sobre o rendimento em ésteres etílicos nas reações utilizando o solvente n-hexano. No entanto, levou a reações 30 minutos mais rápida.

Apesar de a reação a 60 °C, com agitação, apresentar um rendimento em ésteres elevado, ainda assim, a combinação de parâmetros utilizando o solvente n-hexano, que leva a um rendimento máximo em ésteres etílicos mais alto seria a 60 °C, sem agitação, durante 90 minutos, conforme está destacado na Tabela IV.7.

Quando se observa as Tabelas IV.4 e IV.7, nota-se que independente do álcool utilizado e da agitação, os rendimentos máximos em ésteres nas reações com n-hexano são semelhantes, exceto para a temperatura de 60 °C que se destaca nas reações com etanol, com rendimentos máximos em ésteres elevados, mostrando-se a mais adequada para as reações com este solvente.

Já Figura IV.11 apresenta o rendimento em ésteres etílicos em função do tempo, com e sem o uso da agitação, em diferentes temperaturas utilizando o solvente clorofórmio.

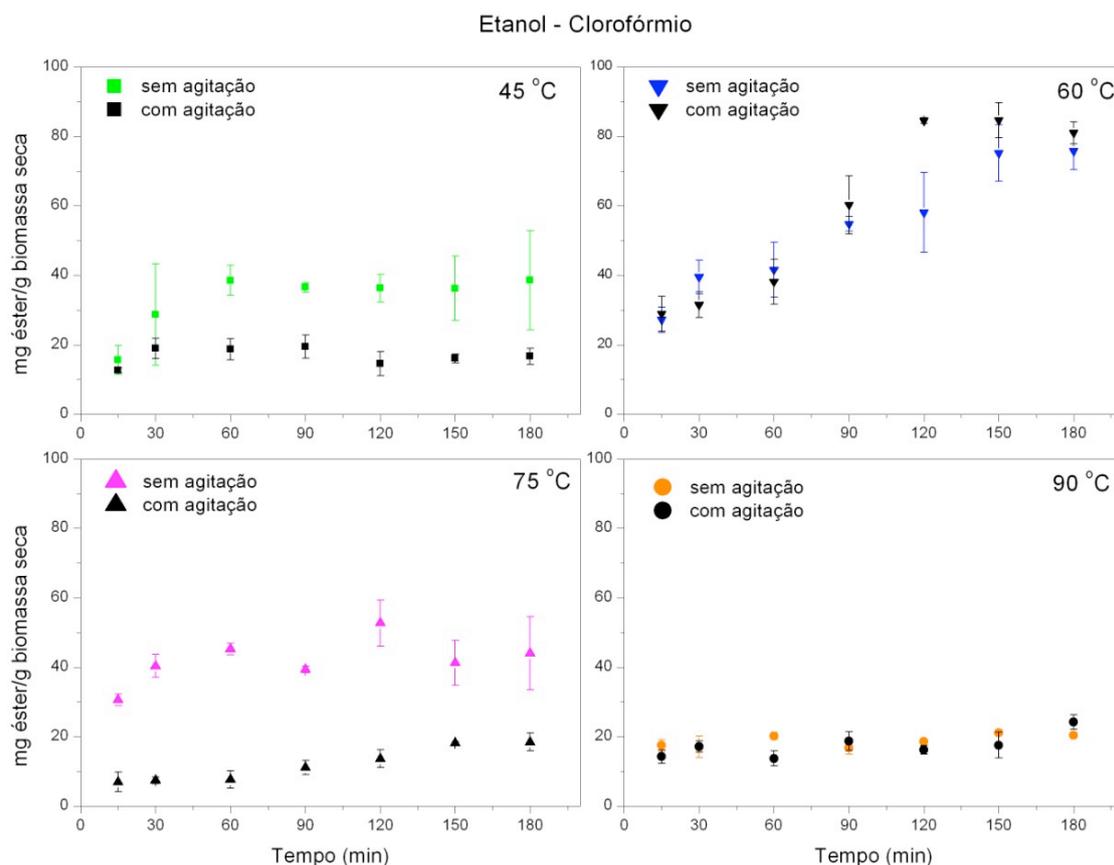


Figura IV. 11– Rendimento em ésteres etílicos em função do tempo, em diferentes temperaturas, com e sem agitação, utilizando solvente clorofórmio.

A partir das curvas cinéticas apresentadas na Figura IV.11, observa-se que as reações com agitação apresentaram um comportamento semelhante ao observado para as reações sem agitação, porém a velocidade de reação foi menor nas temperaturas de 45 e 75 °C e semelhantes nas temperaturas de 60 e 90 °C. Observa-se, também, que as curvas cinéticas tendem a permanecer constante após o seu crescimento inicial.

Novamente, com o intuito de verificar a influência do tempo, nas reações com agitação, no rendimento em ésteres etílicos para cada temperatura, primeiramente, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o tempo de reação, com posterior teste de médias (*post-hoc*), para o solvente clorofórmio.

Nas reações realizadas com etanol e clorofórmio, com agitação, a análise de variância revelou que o tempo de reação influencia significativamente no rendimento em ésteres, independente da temperatura utilizada. Assim, a partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ* foi possível determinar o tempo

de reação necessário para se obter o rendimento máximo em ésteres para cada temperatura estudada, conforme apresentado na Tabela IV.8.

Tabela IV. 8– Rendimento máximo em ésteres etílicos, para as reações *in situ* realizadas utilizando o solvente clorofórmio, com e sem agitação, em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)			
	Sem agitação		Com agitação	
	Clorofórmio	Tempo (min)	Clorofórmio	Tempo (min)
45	15,61	15	12,63	15
60	75,17	150	84,54	120
75	40,37	30	13,72	120
90	17,54	15	24,23	180

Dentre os resultados apresentados na Tabela IV.8, observa-se que os rendimentos máximo em ésteres obtidos nas reações realizadas com agitação são menores do que os obtidos nas reações sem agitação nas temperaturas de 45 e 75 °C e semelhantes nas reações realizadas a 60 e 90 °C, como também pôde ser observado pelas curvas cinéticas. No entanto, o rendimento máximo em ésteres mais alto obtido foi 84,54 mg ésteres/g biomassa seca na reação com agitação, utilizando o solvente clorofórmio, a 60 °C, durante 120 minutos de reação.

Nota-se que a agitação não influenciou da forma esperada sobre o rendimento em ésteres etílicos e na diminuição do tempo nas reações utilizando o solvente clorofórmio, exceto quando a reação foi realizada a 60 °C.

Quando se observa as Tabelas IV.5 e IV.8, nota-se que independente do álcool utilizado e do uso da agitação, os maiores valores de rendimentos máximo em ésteres nas reações com clorofórmio são obtidos na temperatura de 60 °C, mostrando-se, também, a mais adequada para as reações com clorofórmio.

Destaca-se que os maiores rendimentos em ésteres etílicos foram obtidos utilizando a temperatura de 60 °C, independente do solvente utilizado e do uso ou não de agitação, corroborando com os dados descritos na literatura (EHIMEN et al., 2010; BAUMGÄRTNER; 2011; VELASQUEZ-ORTA et al., 2012).

Observa-se que ambos solventes utilizados levam a altos rendimentos, porém, suas combinações exigem condições de tempo diferentes. Fica evidente que o solvente n-hexano necessita de menos tempo para se alcançar o rendimento máximo em ésteres, independente do uso ou não da agitação, com tempos variando entre 60 e 90 minutos. Já com o solvente clorofórmio obtém-se rendimento máximo em ésteres após 120 e 150 minutos, para as reações com e sem agitação, respectivamente.

Ainda pode-se notar que quando as reações foram realizadas com agitação houve uma pequena diminuição (30 minutos) no tempo necessário para se atingir o rendimento máximo em ésteres etílicos utilizando o solvente n-hexano, apresentando este comportamento para as reações com clorofórmio apenas na temperatura de 60 °C. Observando os rendimentos máximos em ésteres das Tabelas IV.7 e IV.8, nota-se que a agitação não levou a um aumento significativo no rendimento. Este fato pode estar ligado ao tipo de agitação menos intensa que foi utilizado (agitação em banho e não mecânica), à pequena quantidade de matéria-prima utilizada nas reações ou, ainda, ao uso dos solventes, pois de acordo com Xu e Mi (2011) a utilização de um cosolvente é essencial para o desenvolvimento da transesterificação *in situ*.

Ainda segundo Xu e Mi (2011), o cosolvente é capaz de extrair o óleo e ser miscível a ele e, ao mesmo tempo ser miscível também ao álcool. Esta capacidade do solvente promove a formação espontânea de um sistema monofásico no meio reacional, deixando de ser essenciais fatores como agitação e aquecimento para o desenvolvimento da reação. Logo, neste trabalho, o n-hexano e o clorofórmio podem ter atuado como cosolvente explicando os rendimentos em ésteres obtidos em temperaturas não tão altas, como a de 60 °C.

Portanto, após todas as análises realizadas pode-se destacar que a melhor condição para a realização das reações de transesterificação *in situ* utilizando etanol foi a 60 °C utilizando o solvente n-hexano, sem a necessidade de agitação, durante 90 minutos de reação.

A Tabela IV.9 reúne os rendimentos máximos em ésteres metílicos e etílicos obtidos que mais se destacaram, com as combinações dos parâmetros solvente, temperatura, tempo e agitação.

Tabela IV. 9 – Rendimento máximo em ésteres metílicos e etílicos.

Álcool	Rendimento (mg ésteres/g biomassa seca)	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Agitação
Metanol	73,12	clorofórmio	60	120	Com agitação
Etanol	84,84	n-hexano	60	90	Sem agitação
Etanol	64,17	n-hexano	60	60	Com agitação
Etanol	75,17	clorofórmio	60	150	Sem agitação
Etanol	84,54	clorofórmio	60	120	Com agitação

Por meio da Tabela IV.9 fica claro que a temperatura de 60 °C se mostrou a mais adequada para realizar a transesterificação *in situ* independente do álcool, para os sistemas de reação utilizados aqui. Para Demirbas (2009), o uso desta temperatura está relacionado ao ponto de ebulição dos reagentes de reação, pois temperaturas superiores a esta levariam à ebulição dos mesmos e, conseqüentemente, um menor contato entre os reagentes e a biomassa acarretando a diminuição do rendimento em ésteres.

Observa-se, também, que as reações realizadas utilizando o solvente clorofórmio apresentaram rendimento máximo em tempos superiores a 120 minutos, independente do álcool utilizado. Já quando foi utilizado o n-hexano as reações foram mais rápidas, entre 60 e 90 minutos, mostrando que o n-hexano é o solvente mais adequado para estes sistemas.

Dentre os resultados obtidos neste estudo, o etanol foi o álcool que levou a maiores rendimentos em ésteres em diferentes condições de reação. Wahlen et al. (2011) estudaram a influência de quatro diferentes alcoóis na extração de triacilglicerídeos e posterior produção de ésteres de ácidos graxos e observou que o metanol é o álcool que tem a menor capacidade de extrair os ácidos graxos e o etanol é o que possui a maior capacidade de extração, sendo que ambos produzem aproximadamente a mesma quantidade de ésteres. Porém, na transesterificação *in situ* álcool exerce um papel de extrema importância, pois o mesmo deve agir como agente extrator e transesterificante na reação (WAHLEN et al., 2011), justificando os maiores rendimentos obtidos quando se utilizou o etanol no presente trabalho.

A escolha da melhor combinação de parâmetros deve ser feita levando em consideração a disponibilidade do álcool e do solvente, além de custos com agitação e

tempo de reação. Logo, a combinação mais adequada para este estudo foi a utilização de etanol, n-hexano a 60 °C durante 90 minutos sem agitação.

IV.3.3 Perfil de ésteres metílicos e etílicos produzidos nas reações *in situ*

Por meio das análises cromatográficas dos produtos das reações de transesterificação *in situ* realizadas foi possível obter o perfil de ésteres metílicos e etílicos. As Figuras IV.12 e IV.13 apresentam a composição em ácidos graxos do óleo da microalga *Scenedemus sp.* e o perfil de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos obtidos nas reações, respectivamente.

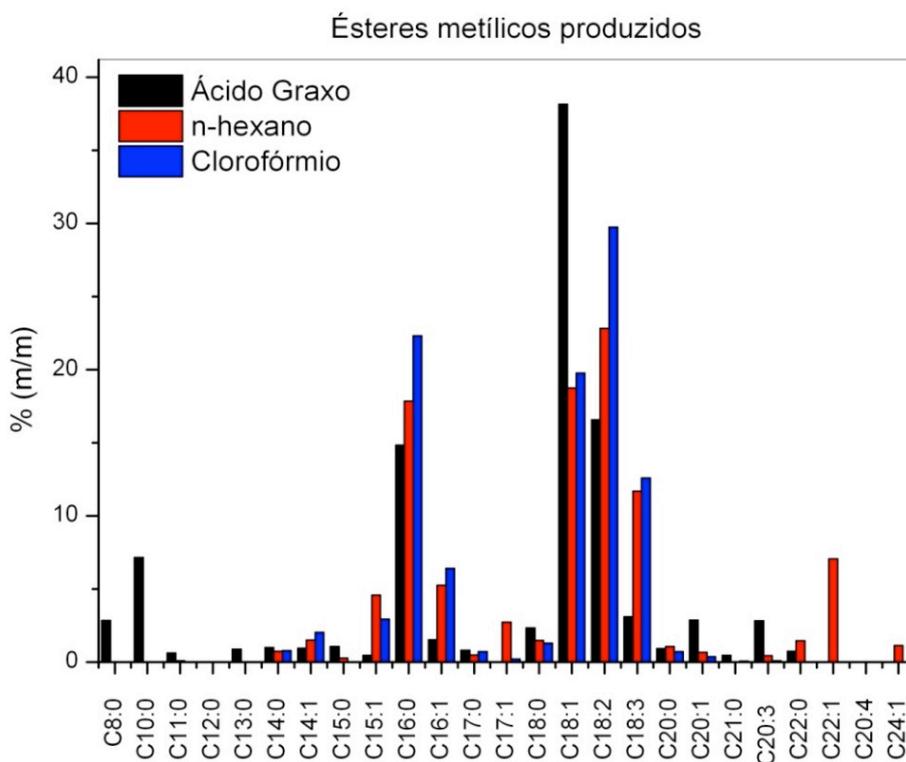


Figura IV. 12 – Composição em ácidos graxos do óleo de microalga e perfil de ésteres metílicos produzidos, utilizando o solvente n-hexano e clorofórmio.

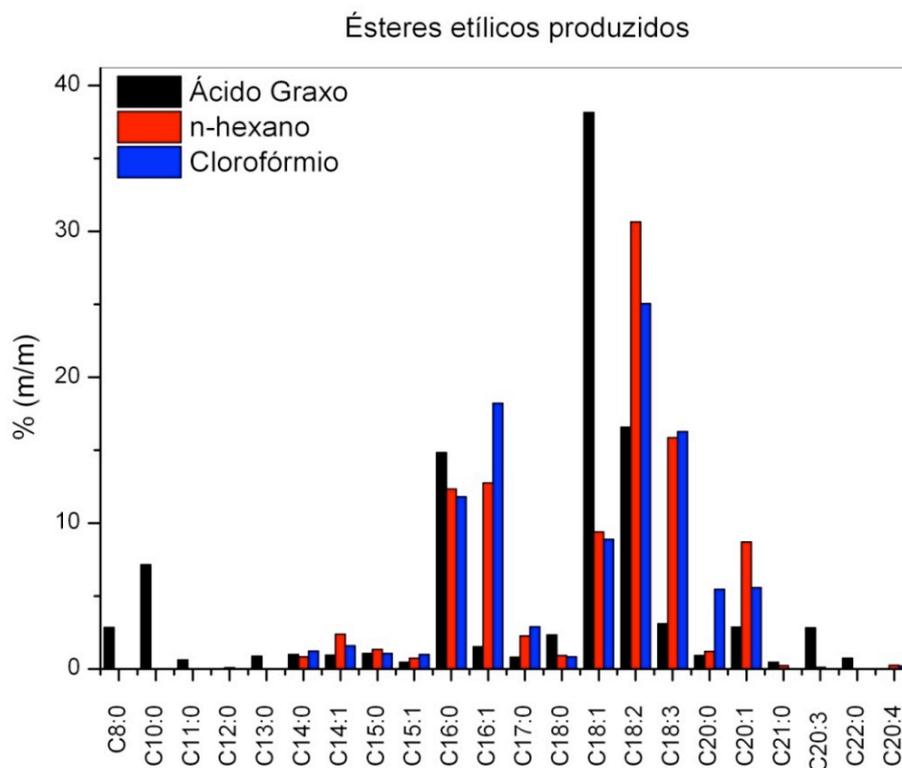


Figura IV. 13—Composição em ácidos graxos do óleo de microalga e perfil de ésteres etílicos produzidos, utilizando o solvente n-hexano e clorofórmio.

Por meio das Figuras IV.12 e IV.13 observa-se que apesar de o óleo da microalga possuir ácidos graxos de cadeia curta, os mesmo não estão presentes, ou estão em quantidades pequenas, no perfil de ésteres produzidos nas reações, independente do álcool e solvente utilizado.

A diferença observada por meio das Figuras IV.12 e IV.13 entre a composição em ácidos graxos e o perfil de ésteres de ácidos graxos produzidos na reação *in situ* pode estar relacionada à forma com que os reagentes têm acesso a célula da microalga e ao meio reacional da transesterificação *in situ*. Este comportamento também foi observado por Velasquez-Orta et al. (2012) na transesterificação *in situ* da microalga *Chlorella vulgaris*.

As maiores proporções de ésteres metílicos produzidos, mais de 70%, foram de C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, com a predominância de ácidos graxos insaturados. Já para os ésteres etílicos produzidos as maiores proporções, mais de 70%, foram de, C16:0, C16:1, C18:2 e C18:3 com a predominância de ácidos graxos insaturados.

Como já discutido anteriormente, o perfil de ésteres obtido indica que o biodiesel produzido a partir da biomassa de microalgas tende a ter um ganho na propriedade ponto de entupimento do filtro a frio, devido à presença de ácidos graxos insaturados, por outro lado, pode apresentar perdas na estabilidade oxidativa. Desta maneira, os resultados indicam que uma mistura de espécies de microalgas pode levar a um biodiesel de qualidade, pois nenhuma espécie possui todas as características ideais para a produção de biodiesel, embora muitas possuam as características principais.

Cabe ressaltar que o perfil de ácidos graxos obtido a partir da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* é semelhante as principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel (óleo de soja e milho), sendo estes compostos, predominantemente, pelos ácidos graxos C16 e C18 (RAMOS et al., 2009; LEUNG et al., 2010; KRHON et al., 2011), que leva a ganhos na qualidade final do biodiesel.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Na extração do óleo de microalga *Scenedesmus sp.* foi possível observar que o método e o tipo de solvente utilizado têm influência direta no teor de lipídeos obtidos. Independente do solvente utilizado é necessário realizar a purificação dos lipídeos obtidos com o intuito de eliminar os compostos indesejáveis para a reação de transesterificação, como, por exemplo, os pigmentos.

No processo de purificação, o uso de uma coluna recheada com carvão ativado de osso se mostrou extremamente eficiente na remoção dos compostos indesejáveis para a reação de transesterificação, como foi comprovado qualitativamente e pela espectroscopia UV-vis.

A caracterização do óleo da microalga *Scenedesmus sp.* foi de extrema importância na determinação do tipo de catalisador que pode ser utilizado, devido ao alto índice de acidez apresentado pela amostra, indicando assim o uso de catalisadores ácidos. A composição em ácidos graxos do óleo da microalga e o perfil de ésteres são semelhantes à composição em ácidos graxos do óleo de soja, principal matéria-prima hoje utilizada para a produção de biodiesel no Brasil, o que pode levar à produção de um biodiesel de qualidade, segundo as normas de padronização da ANP.

Os resultados obtidos por meio da transesterificação *in situ* indicaram que o etanol se mostrou mais eficiente na produção de ésteres, levando a rendimentos superiores ao metanol, em diferentes condições de reação. Este resultado é de extrema importância, pois, além de levar a rendimentos em ésteres mais elevados, torna possível a utilização de um reagente de origem renovável, além é claro, de seu menor custo quando comparado ao metanol, devido a sua disponibilidade no Brasil.

A escolha da melhor combinação de parâmetros de reação deve ser realizada levando-se em consideração a disponibilidade do álcool e do solvente, além de custos

com agitação e tempo de reação. Desta maneira, a combinação mais adequada para este estudo foi a utilização de etanol e n-hexano a 60 °C, durante 90 minutos, sem agitação. Nesta condição ótima foi obtido rendimento em ésteres de 84,84 mg ésteres/g biomassa seca.

Além disso, os valores de rendimento observados no presente trabalho indicam que a transesterificação *in situ* apresentou-se com grande potencial de utilização, devido à possibilidade de redução de custos relacionados ao tempo de processo e ao uso de solventes, quando comparada ao processo clássico de extração e/ou purificação do óleo, sendo evidenciados na reação *in situ* rendimentos em ésteres elevados.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

- ANP – Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. *Biocombustíveis*. disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em: 09/2012.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. *Boletim Mensal do Biodiesel*, março de 2013.
- AHMAD, A. L., YASIN, N. H. M, DEREK, C. J. C., LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.
- AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v.1, n.1, p. 57-66, set. 2007.
- AMARO, H. M., GUEDES, A. C., MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, out. 2011.
- BAUMGÄRTNER, T. R. D. S. *Cultivo e Extração de Óleo das Microalgas Scenedesmus sp. e Spirulina sp. para a Síntese de Ésteres Visando a Produção de Biodiesel*. Maringá: UEM, 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, 2011.
- BAUMGÄRTNER, T. R. D. S. BURAK, J. A. M., KOGIKOSKI, M. E., SEBASTIEN, N. Y., ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus*

- acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, p. 250-255, abr./jun. 2013a.
- BAUMGÄRTNER, T. R. D. S. BURAK, J. A. M., ZANIN, G. M., BAUMGÄRTNER, D., SEBASTIEN, N. Y., ARROYO, P. A. Different methods for extracting oil from the microalga *Scenedesmus accuminatus* for biodiesel production. *Br J Anal Chem*, v.10, p. 441-445, 2013b.
- BAUMGÄRTNER, T. R. D. S. BURAK, J. A. M., ZANIN, G. M., BAUMGÄRTNER, D., ARROYO, P. A. Biomass production and ester synthesis by *in situ* transesterification/esterification using the microalgae *Spirulina pletensis*. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2013c.
- BECKER, E. W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 1994, 293p.
- BICUDO, C. E. M. e MENEZES, M. *Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para Identificação e Descrições*. São Carlos: Editora RiMa, 2005, 580p.
- BIODIESEL NO BRASIL, 2008. Disponível em: www.biodieselbr.com. Acesso em: 09/2012.
- BLIGH E G., DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 557-577, fev. 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, mai.-jun. 2007.

- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, v. 50, n. 1, p. 14-34, jan. 2009.
- DEMIRBAS, A., DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 1, p. 163-170, jan. 2011.
- D'OCA, M. G. M., VIÊGAS, C. V., LEMÕES J. S., MIYASAKI E. K., MORONVILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and bioenergy*, v. 35, n. 4, p. 1533-1538, abr. 2011.
- EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, v. 89, n. 3, p. 677-684, 2010.
- FREEDMAN, B., PRYDE, E. H., MOUNTS, T.L. Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. *JAACS*, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, out. 1984.
- GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, jun. 2005.
- GODINHO, L. R., GONZÁLEZ, A. A. C., BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). *Hoehnea*, v. 37, n.3, p. 513-533, 2010.
- HAAS, M. J., WAGNER, K. M. Substrate Pretreatment can Reduce the Alcohol Requirement During Biodiesel Production Via in Situ Transesterification. *J Am Oil Chem Soc.*, v. 88, p. 1203-1209, 2011.
- HALIM, R. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 709-732, mai.-jun. 2012.

- HARRINGTON, K. J., D'ARCY-EVANS, C. A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *JAACS*, v. 62, n. 6, p. 1009-1013, jun. 1985.
- HARTMANN, L.; LAGO, R.C.A.. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, jul. 1973.
- HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M., DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, v. 54, 621-639, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Câmara Brasileira do Livro-SP, 3ª Edição, Vol. 1. São Paulo, 1985.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 673-690, jun. 2011.
- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, abr. 2010.
- LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, v. 43, n. 2, p. 107-116, dez. 2000.
- JOHNSON, M. B., WEN, Z. Production of biodiesel fuel from the microalgae *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy & Fuels*, v. 23, p. 5179-5183, 2009.
- KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P. *Manual do Biodiesel*. Editora Edgard Blücher, São Paulo-SP, 2006.

- KROHN, B. J., MCNEFF, C. V., YAN, B., NOWLAN, D. Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan[®] process. *Bioresource Technology*, v. 102, n.1, p. 94-100, jan. 2011.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232, jan. 2010.
- MAESTRIN, A. P. J., NERI, C. R., OLIVEIRA, K. T., SERRA, O. A., IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.
- MDA – Ministério de Desenvolvimento Agrário. *Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel*, disponível em:
<http://www.mda.gov.br/portal/saf/programas/biodiesel/2286217>. Acesso em: 09/2012.
- MEDINA, A. R., GRIMA, E. M., GIMÉNEZ, A. G., GONZÁLEZ, M. J. I. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 16, n. 3, p. 517-580, maio 1998.
- MIAO, X., WU, Q. Biodiesel Production from Heterotrophic Microalgal Oil. *Bioresource Technology*, v. 97, n.6, p. 841-846, abr. 2006.
- NASCIMENTO, I. A., MARQUES, S. S. I., CABANELAS, I.T. D., PEREIRA, S. A., DRUZIAN, J. I., SOUZA, C. O., VICH, D. V., CARVALHO, G. C., NASCIMENTO, M. A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *BioEnergy Research*, v. 6, n. 1, p. 1-13, mar. 2013.
- RAMOS, M. J., FERNÁNDEZ, C. M., CASAS, A., RODRÍGUEZ, L., PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 261-268, jan. 2009.

- SHARMA, Y. C., SINGH, B., UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, v. 87, n. 12, p. 2355-2373, set. 2008.
- SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, dez. 2010.
- STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel*, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.
- VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B., 2006, *Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação*, Ed. Varela, São Paulo, 120p.
- VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, v.35, n. 2, p. 274-279, 2012.
- VELASQUEZ-ORTA, S. B.; LEE, J. G. M.; HARVEY, A. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, v. 94, p. 544-550, abr. 2012.
- XU, H., MIAO, X., WU, Q. High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 126, n. 4, p. 499–507, dez. 2006.
- XU, R., MI, Y. Simplifying the Process of Microalgal Biodiesel Production Through In Situ Transesterification Technology. *J Am Oil Chem Soc.*, v. 88, n. 1, p.91-99, jan. 2011.
- WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M., SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 2724-2730, fev. 2011.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the institute of applied microbiology, University of Tokyo. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1960, Vol. 6, n°. 4.