

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALÉRIA FERREIRA CAVALCANTI

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* EM
BIOMASSA DE MICROALGAS PROVENIENTES DE UM SISTEMA DE
TRATAMENTO DE EMISSÕES ATMOSFÉRICAS

CURITIBA

2015

VALÉRIA FERREIRA CAVALCANTI

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* EM
BIOMASSA DE MICROALGAS PROVENIENTES DE UM SISTEMA DE
TRATAMENTO DE EMISSÕES ATMOSFÉRICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra.

Orientador: Dr. Marcelo Real Prado
Co-orientador: Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2015

C376s

Cavalcanti, Valéria Ferreira

Síntese de ésteres etílicos por transesterificação in situ em biomassa de microalgas provenientes de um sistema de tratamento de emissões atmosféricas/ Valéria Ferreira Cavalcanti. – Curitiba, 2015.
97 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioenergia, 2015.

Orientador: Marcelo Real Prado – Co-orientador: Luiz Pereira Ramos.
Bibliografia: p. 80-93.

1. Microalgas. 2. Transesterificação. 3. Esteres. 4. Biodiesel. I. Universidade Federal do Paraná. II. Prado, Marcelo Real. III. Ramos, Luiz Pereira . IV. Título.

CDD: 662.88

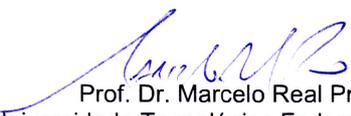


Universidade Federal do Paraná
Setor de Palotina
Programa de Pós-Graduação em
BIOENERGIA

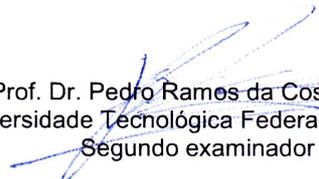


PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOENERGIA, Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná, após arquir a mestranda **Valéria Ferreira Cavalcanti** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* EM BIOMASSA DE MICROALGAS PROVENIENTES DE UM SISTEMA DE TRATAMENTO DE EMISSÕES ATMOSFÉRICAS**", é de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de *Mestre* em BIOENERGIA, Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná.


Prof. Dr. Marcelo Real Prado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora


Dr. Bill Jorge Costa
Instituto de Tecnologia do Paraná
Primeiro examinador


Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Segundo examinador

Palotina, 28 de julho de 2015.


Prof. Dr. Helton José Alves
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em BIOENERGIA

Para Rodrigo e Luana.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Real Prado, por me aceitar neste projeto, pela confiança depositada e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, por ter compartilhado seu conhecimento, pelas valiosas sugestões e paciência.

Ao Anderson Cardoso Sakuma e Leandro Andrade Pegoraro, por todas as informações essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do TECPAR, em especial ao biólogo Tobias Carlos Almeida e ao Caio, pelas explicações e ajuda durante a colheita das microalgas.

À administração da Devon's Grill, por permitir o acesso aos fotobiorreatores.

À Bruna Leal, pela companhia no laboratório e amizade.

À Olga Regina Gauza, por ter disponibilizado materiais e reagentes.

Ao Prof. Dr. Arion Zandoná Filho, pelo empenho na realização das cromatografias e por sua disponibilidade.

Ao Doutorando Rafael Kramer, por ter liofilizado a biomassa colhida e por estar sempre disposto a ajudar quando necessário.

À equipe do CEPESQ, em especial à Débora Kochepka, pelo imenso auxílio com as planilhas.

À Dra. Heidegrid Siebert Koop, pela ajuda prestada e sugestões.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo seu amor e dedicação, pelas experiências compartilhadas e por estar sempre ao meu lado, me ajudando a crescer.

À minha filha Luana, meu anjo, por ser fonte de motivação.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional e às minhas avós Guiomar e Dina (*in memoriam*) pelo exemplo de determinação.

Ao Pablo, pela ajuda com os detalhes finais.

Às minhas amigas Nerci, Ann e Lilian, pelo carinho e incentivo.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Muito obrigada.

*"Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e,
com todo o coração,
dedicar-se a ele."*

(Buda)

RESUMO

Considerando os problemas ambientais da atualidade, soluções para minimizar os efeitos da poluição têm sido amplamente investigadas. As microalgas apresentam uma gama de aplicações no tratamento de efluentes, tanto líquidos quanto gasosos, por meio de seu metabolismo fotossintetizante. Pensando nisso, uma churrascaria de Curitiba-PR, implantou um sistema biológico, empregando microalgas, para tratar a fumaça gerada em suas atividades. Estudos vem sendo realizados para agregar valor à biomassa formada. O principal objetivo deste trabalho foi o de avaliar a obtenção de ésteres etílicos a partir da biomassa destas microalgas, com vistas à produção de biodiesel. Os principais parâmetros avaliados foram o rendimento em biomassa seca após a colheita; o teor de lipídeos totais; o índice de acidez dos lipídeos extraídos, a síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos por transesterificação *in situ* e o perfil composicional com relação ao uso como biodiesel. Os resultados revelaram que a quantidade em peso seco de biomassa de microalgas foi satisfatória, atingindo maior concentração comparado aos cultivos anteriores. Após a eletro flotação, foi necessária uma etapa de sedimentação antes que se procedesse à liofilização. O rendimento em biomassa liofilizada chegou a 0,3397 g.L⁻¹. A biomassa apresentou um teor de lipídeos totais de 18% quando usado metanol ou etanol e 11,44 % quando foi usado n-hexano como solvente extrator. O índice de acidez do extrato lipídico foi de 29,54 ± 2,76 mg KOH.g⁻¹. Nas reações de transesterificação *in situ*, foram avaliados os parâmetros temperatura e tempo de reação. A identificação e quantificação dos ésteres etílicos de ácidos graxos foram feitas com base em cromatogramas. Degradações de ésteres geraram perda de rendimentos após 30 minutos de reação. Os maiores rendimentos nas temperaturas de estudo (45, 60 e 90 °C) foram obtidos aos 180 minutos de reação, chegando aos 37,81; 40,15 e 43,03 mg de ésteres.g⁻¹ de biomassa liofilizada. O perfil cromatográfico revelou predominância dos ésteres etílicos C16:1 e C18:2 (30 - 35% cada). Este perfil favorece a propriedade de ponto de entupimento de filtro a frio, mas pode apresentar problemas envolvendo baixa estabilidade oxidativa.

Palavras-chave: Microalgas. Transesterificação *in situ*. Ésteres etílicos de ácidos graxos. Mitigação de CO₂. Biodiesel.

ABSTRACT

Taking into consideration the current environmental issues, solutions to minimize the effects of pollution have been widely investigated. Microalgae display several applications in the treatment of effluents, either in liquid or gaseous form, through their photosynthetic metabolism. In this line of thinking, a barbecue restaurant in Curitiba-PR, implemented a biological system, employing microalgae, to process the smoke generated in its activities. Studies have been done to accrue value to the formed biomass. The main objective of this project was to evaluate the obtention of ethyl esters from this microalgae biomass, aiming at the production of biodiesel. The main parameters evaluated were the yield of dry biomass after harvest; total lipids; the acidity of extracted lipids; obtention of fatty acids ethyl esters through *in situ* transesterification and evaluating its compositional profile regarding its use as biodiesel. The results revealed that the amount in dry weight, of microalgae biomass was satisfactory, reaching a higher concentration regarding previous cultures. After the electroflotation, a sedimentation stage was necessary so the lyophilization could proceed. The lyophilized biomass yield reached 0.3397 mg.L^{-1} . The biomass presented a total lipid content of around 18% when methanol or ethanol were used, and of 11.44% when n-hexane was used. The acidity index from lipids was $29.54 \pm 2.76 \text{ mg KOH.g}^{-1}$. In *in situ* transesterification reactions, the temperature and reaction time parameters were evaluated. The identification and quantification of ethyl esters of fatty acids were made based on chromatograms. Esters degradation generates a loss in productivity after 30 minutes. The highest yields in the temperature studies (45, 60 e $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$) were obtained at 180 minutes of reaction, reaching 37.81; 40.15 e $43.03 \text{ mg of esters.g}^{-1}$ of dry biomass. The chromatographic profile revealed the predominance of ethyl esters C16:1 and C18:2 (30 - 35% each). This profile is favorable to the cold-filter plugging point, but can present problems involving low oxidative stability.

Keywords: Microalgae. *In situ* transesterification. Fatty acids ethyl esters. CO_2 mitigation. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO....	20
FIGURA 2	- ESQUEMA COMPARATIVO: MÉTODO CONVENCIONAL DE TRANSESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i>	30
FIGURA 3	- PRODUÇÃO MUNDIAL DE BIODIESEL 2012-2013.	31
FIGURA 4	- MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL: PERFIL NACIONAL COM BASE NO MÊS DE MAIO DE 2015.....	33
FIGURA 5	- CULTIVO EM LAGOAS.....	37
FIGURA 6	- CULTIVO EM TANQUES CIRCULARES.....	37
FIGURA 7	- CULTIVO EM TANQUES <i>RACEWAY</i>	37
FIGURA 8	- FOTOBIOREATOR TUBULAR.....	38
FIGURA 9	- FOTOBIOREADORES DE PLACAS PLANAS.....	38
FIGURA 10	- SISTEMA PARA TRATAMENTO E APROVEITAMENTO DE FUMAÇA EM FOTOBIOREADORES CONTENDO MICROALGAS.....	44
FIGURA 11	- ELETRODOS DE ALUMÍNIO FIXADOS NO FUNDO DA CUBA ELETROLÍTICA.....	48
FIGURA 12	- MICROSCOPIA ÓPTICA DA MESCLA DEVON'S E MESCLA DEVON'S 2.....	49
FIGURA 13	- ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS REALIZADAS PARA A OBTENÇÃO DA BIOMASSA LIOFILIZADA DA MD2.	52
FIGURA 14	- ESQUEMA DE MONTAGEM DO APARATO PARA EXTRAÇÃO EM SOXHLET.....	56
FIGURA 15	- ELETROFLOTADOR EM FUNCIONAMENTO.....	62
FIGURA 16	- BIOMASSA LIOFILIZADA DA MD2.....	63
FIGURA 17	- TEOR DE RESÍDUOS PRESENTES NA SUSPENSÃO DE MICROALGAS DO FOTOBIOREATOR.....	64

FIGURA 18 - LIPÍDEOS TOTAIS DA MD2 OBTIDOS POR SOXHLET.....	65
FIGURA 19 - EXTRATOS LIPÍDICOS DA MD2 OBTIDOS POR SOXHLET.....	68
FIGURA 20 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DE CLOROFILA.....	69
FIGURA 21 - QUANTIDADE DE ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS NA TRANSESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.....	72
FIGURA 22 - QUANTIDADE DE ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus sp.</i>	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	PADRÕES DE QUALIDADE DO BIODIESEL.....	23
TABELA 2	-	LIMITES DE PONTO DE ENTUPIMENTO DE FILTRO A FRIO.....	25
TABELA 3	-	COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA BIODIESEL.	27
TABELA 4	-	COMPOSIÇÃO DOS GASES INORGÂNICOS PRESENTES NA FUMAÇA DA CHAMINÉ DA CHURRASCARIA DEVON'S.....	45
TABELA 5	-	CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA UTILIZADA NOS FOTOBIOREACTORES.	46
TABELA 6	-	MICROALGAS CONSTITUINTES DA MESCLA DEVON'S.....	47
TABELA 7	-	COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU.....	48
TABELA 8	-	CARACTERÍSTICAS DOS SOLVENTES EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA DA MD2.....	56
TABELA 9	-	LIPÍDEOS TOTAIS DA BIOMASSA DA MD2.	65
TABELA 10	-	QUANTIDADE DE ÉSTERES PRODUZIDOS POR TRANSESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> DA BIOMASSA DA MD2.....	71
TABELA 11	-	PERFIL COMPOSICIONAL DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS NA TRANSESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> DA MD2. ..	75

LISTA DE SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ATP	- Adenosina trifosfato
APROBIO	- Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil
ASTM	- American Society for Testing and Materials
BEN	- Balanço Energético Nacional
CEN	- Comité Européen de Normalisation
INPI	- Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ISO	- International Organization for Standardization
LAPREBB	- Laboratório de Pesquisa Relacionada à Biomassa e Bioenergia
NPDEAS	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
PEAD	- Polietileno de Alta Densidade
PNPB	- Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
ProÁlcool	- Programa Nacional do Álcool
SENAI	- Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
TECPAR	- Instituto de Tecnologia do Paraná
UE	- União Europeia
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UTFPR	- Universidade Tecnológica Federal Do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	-	por cento
<	-	menor que
≤	-	menor ou igual que
±	-	mais ou menos
®	-	marca registrada
B100	-	biodiesel puro
BX	-	mistura diesel-biodiesel, onde X é a porcentagem em volume do biodiesel
CaCO ₃	-	carbonato de cálcio
CG	-	cromatografia gasosa
Cl ⁻	-	cloreto (íon)
cm	-	centímetro
CO ₂	-	dióxido de carbono
ed.	-	edição
f	-	fator de correção
F ⁻	-	fluoreto (íon)
g	-	grama (s)
h	-	hora (s)
Hz	-	Hertz
HCl	-	ácido clorídrico
IA	-	índice de acidez
k	-	quilo
kg	-	quilograma (s)
KOH	-	hidróxido de potássio
L	-	litro (s)
LT	-	lipídeos totais
m ³	-	metros cúbicos
Máx.	-	máximo (a)
MD	-	mescla Devon's
MD2	-	mescla Devon's 2

m/m	-	fração mássica
mg	-	miligrama (s)
mg.g ⁻¹	-	miligramas por grama
mg.L ⁻¹	-	miligramas por litro
mg KOH.g ⁻¹	-	miligramas de hidróxido de potássio por grama
mg Pt.L ⁻¹	-	miligrama de platina por litro
mg.Nm ⁻³	-	miligramas por normal metro cúbico
min	-	minuto (s)
Mín.	-	mínimo (a)
mol.L ⁻¹	-	mol por litro
mL	-	mililitro (s)
mm	-	milímetro (s)
mm ² .s ⁻¹	-	milímetros quadrados por segundo
Mn	-	manganês
N	-	nitrogênio
NaCl	-	cloreto de sódio
NBR	-	denominação de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas
n ^o .	-	número
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NO ₂	-	dióxido de nitrogênio
NO ₃ ⁻	-	íon nitrato
O ₂	-	oxigênio (gás)
°C	-	graus Celsius
p.	-	páginas
pH	-	potencial hidrogeniônico
Pa	-	Pascal
RF	-	resíduo filtrável
RNF	-	resíduo não filtrável
RT	-	resíduo total
s	-	desvio padrão
SiO ₂	-	dióxido de silício
SO ₄ ⁻	-	íon sulfato

U pH	- unidades de pH
UNT	- unidades nefelométricas de turbidez
V	- volume
v/v	- fração volumétrica
V _{NaOH}	- volume de hidróxido de sódio
VPM	- valor máximo permitido
μL	- microlitro (s)
μm	- micrômetro (s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 BIODIESEL	19
2.1.1 Padrões de qualidade	22
2.1.2 Matérias-primas.....	26
2.1.2.1 Microalgas como matéria-prima para biodiesel.....	28
2.1.3 Os cenários global e brasileiro	31
2.2 MICROALGAS	33
2.2.1 Sistemas de produção.....	35
2.2.1.1 Produção autotrófica	35
2.2.1.2 Produção heterotrófica	39
2.2.1.3 Produção mixotrófica.....	39
2.2.2 Tecnologias de colheita da biomassa	40
2.2.3 Tecnologias de extração de lipídeos.....	42
2.3 O SISTEMA PARA TRATAMENTO DE EMISSÕES GASOSAS.....	44
3 OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 MICROALGAS E REAGENTES.....	51
4.2 OBTENÇÃO DA BIOMASSA	51
4.2.1 Condições de cultivo	51
4.2.2 Colheita e secagem.....	51
4.2.3 Determinação de resíduos	52

4.2.3.1 Resíduos totais (RT)	52
4.2.3.2 Resíduos não filtráveis (RNF)	53
4.2.3.3 Resíduos filtráveis (RF).....	55
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA	55
4.3.1 Determinação de lipídeos totais (LT)	55
4.3.2 Determinação do Índice de acidez (IA)	57
4.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÉSTERES.....	58
4.4.1 Reação de transesterificação <i>in situ</i>	58
4.4.2 Análises cromatográficas	59
4.4.3 Quantificação dos ésteres etílicos.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 COLHEITA	61
5.2 RESÍDUOS.....	63
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS	65
5.3.1 Lipídeos totais	65
5.3.2 Características dos extratos obtidos com diferentes solventes	68
5.3.3 Índice de acidez	70
5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES	71
5.4.1 Rendimento dos ésteres etílicos produzidos.....	71
5.4.2 Perfil cromatográfico	74
6 CONCLUSÕES	77
7 SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES	78
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICES	94

1 INTRODUÇÃO

A substituição parcial dos derivados do petróleo por biocombustíveis líquidos parece ser uma opção inadiável, decorrente da busca mundial pelo equilíbrio ecológico sustentado na redução das emissões de dióxido de carbono (ZUNIGA *et al.*, 2011). 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, que é comumente reconhecido como uma alternativa verde ao diesel de petróleo e oriundo de fontes renováveis (BRANCO, 2013).

A ampliação da produção de biocombustíveis é atribuída à discussão internacional sobre mudanças do clima e às tentativas do aumento da produção de energias renováveis com conseqüente diminuição de emissão de dióxido de carbono (CO₂) (FREITAS; THOMÉ; BOUDEAUX-REGO, 2013). Dentre os biocombustíveis, destacam-se o etanol, que no Brasil é amplamente produzido a partir da cana-de-açúcar, e o biodiesel, produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. Este combustível tem propriedades mais atraentes do que o diesel de petróleo, do ponto de vista ambiental, tais como a biodegradabilidade, a origem em fontes renováveis, a ausência de toxicidade, sendo essencialmente livre de enxofre e compostos aromáticos (ZAGO, 2010).

O interesse nas microalgas para a produção de biodiesel se deve ao seu alto conteúdo de lipídeos em algumas espécies e ao fato de que a síntese destes pode ser manipulada por mudanças nas condições de cultivo (ARIAS PEÑARANDA; MARTÍNEZ ROLDÁN; CAÑIZARES VILLANUEVA, 2013).

A poluição atmosférica tem-se tornado um dos maiores problemas ambientais após a revolução industrial. Com esta, além dos problemas do aquecimento global e de problemas respiratórios, ainda encontram-se os relacionados ao odor produzido por compostos voláteis (MIKAMI, 2011). Vistos os problemas ambientais decorrentes da poluição, evidencia-se a necessidade de encontrar novas alternativas que venham a prevenir e controlar essa poluição de forma eficiente, evitando a degradação ambiental. Os processos biológicos apresentam características apropriadas para auxiliar no combate à poluição, tornando os micro-organismos objetos de diversos estudos e pesquisas (SCHMITZ;

DAL MAGRO; COLLA, 2012). A integração de vários processos visando a máxima economia e benefícios ambientais minimiza a quantidade de resíduos produzidos e o nível de poluição (KIRAN; KUMAR; DESHMUKH, 2014).

O sequestro de gases causadores do aquecimento global tem sido pauta de inúmeros projetos em que organismos fotossintetizantes absorvem CO₂ e dissolvem-no em biomassa. Microalgas possuem aparato fotossintético para desempenhar este sequestro (VIEIRA, 2011).

Ao longo da última década, o uso de microalgas para a produção de biocombustíveis e sequestro de CO₂ vem se tornando um desafio em todo o mundo. Os custos do processamento ainda são demasiado elevados para que sejam considerados rentáveis, levando à necessidade de encontrar derivados de maior valor para otimizar o valor acrescentado à biomassa (SERIVE *et al.*, 2012).

O Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), utilizou microalgas para desenvolver um sistema de captação de emissões de CO₂ emitidas pela chaminé da churrasceria Devon's Grill, localizada em Curitiba - PR. Inicialmente as algas eram coletadas no Passeio Público (Curitiba, PR), mas com o uso da biotecnologia foi feita uma seleção para as espécies com maior resistência (SCHUTTEL, 2012). A obtenção de novos produtos vem sendo pesquisada a partir das algas utilizadas na metabolização da fumaça. Dentre os produtos que estão sendo explorados estão as linhas de pesquisas para produção de óleo lubrificante e biodiesel (TECPAR, 2013). O sistema consiste de dois fotobiorreatores de placas planas contendo microalgas, para onde a fumaça captada da chaminé é direcionada e injetada. Essas microalgas, através de seu metabolismo em presença de luz, utilizam como nutrientes componentes presentes na fumaça, removendo assim compostos causadores do odor (TÖWS, 2013). Como consequência, ocorre a geração de biomassa de microalgas que podem ser utilizadas na geração de produtos com valor agregado.

Pesquisas têm sido realizadas neste sistema para caracterizar e otimizar o crescimento de biomassa microalgal (D'AQUINO; SCHROEDER, 2009; MIKAMI, 2011; ORTIZ RICO, 2014), facilitar a colheita da biomassa gerada, que atualmente é realizada por eletroflotação (MICHELON, 2013), e investigar o aproveitamento adequado para a biomassa formada (CAVALCANTI *et al.*, 2014; LEAL, 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

Atualmente há uma tendência internacional na busca de combustíveis mais limpos e novas fontes de energia com baixa emissão de carbono (ARIAS PEÑARANDA; MARTÍNEZ ROLDÁN; CAÑIZARES VILLANUEVA, 2013). Os biocombustíveis são considerados fonte de energia limpa e renovável e estão disponíveis em grande abundância na natureza, além de serem produzidos em grande e pequena escala pela agricultura moderna (MMA, 2015).

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. Esse biocombustível substitui total ou parcialmente o diesel de petróleo, em motores do ciclo diesel de caminhões, tratores, veículos utilitários, automóveis e também motores de máquinas que geram energia (MME, 2015), reduzindo a dependência sobre os combustíveis derivados do petróleo e reduzindo a geração das principais emissões presentes nos gases de exaustão (KNOTHE *et al.*, 2006). Além disso, é totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades; possui alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros; apresenta excelente lubricidade e pode ser estocado por um ano sob condições normais de armazenamento, sem mudanças drásticas em seus parâmetros de qualidade (KNOTHE *et al.*, 2006).

Alguns dos problemas inerentes ao biodiesel estão relacionados ao seu alto custo, ao aumento que causa nas emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x) nos gases de exaustão e sua baixa estabilidade quando exposto ao ar (KNOTHE *et al.*, 2006).

No Brasil, a definição oficial de biodiesel é dada através da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, como sendo um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (BRASIL, 2005).

As gorduras são normalmente obtidas de animais e em geral compostas de triacilgliceróis com ácidos graxos saturados ou ácidos graxos com apenas uma ligação dupla. Os óleos são obtidos dos produtos vegetais, como milho, feijão, soja, olivas e amendoim (BRUICE, 2006). Os triacilgliceróis em qualquer óleo vegetal são uma mistura de ácidos graxos insaturados e saturados esterificados ao glicerol;

materiais graxos de animais terrestres possuem teores muito mais elevados de ácidos graxos saturados (MOUSDALE, 2008).

Para se tornar compatível com os motores a diesel, o óleo vegetal precisa passar por um processo químico chamado transesterificação (ANP, 2012), que consiste na transformação de óleos vegetais em uma mistura de ésteres de ácidos graxos por um processo frequentemente descrito como sendo semelhante a "cracking" de petróleo (MOUSDALE, 2008). Neste processo, um mol de triacilglicerol reage com três mols de álcool, usualmente o metanol ou o etanol, na presença de um catalisador, que pode ser homogêneo, heterogêneo ou enzimático (RAMOS *et al.*, 2011). A equação geral da transesterificação encontra-se na Figura 1.

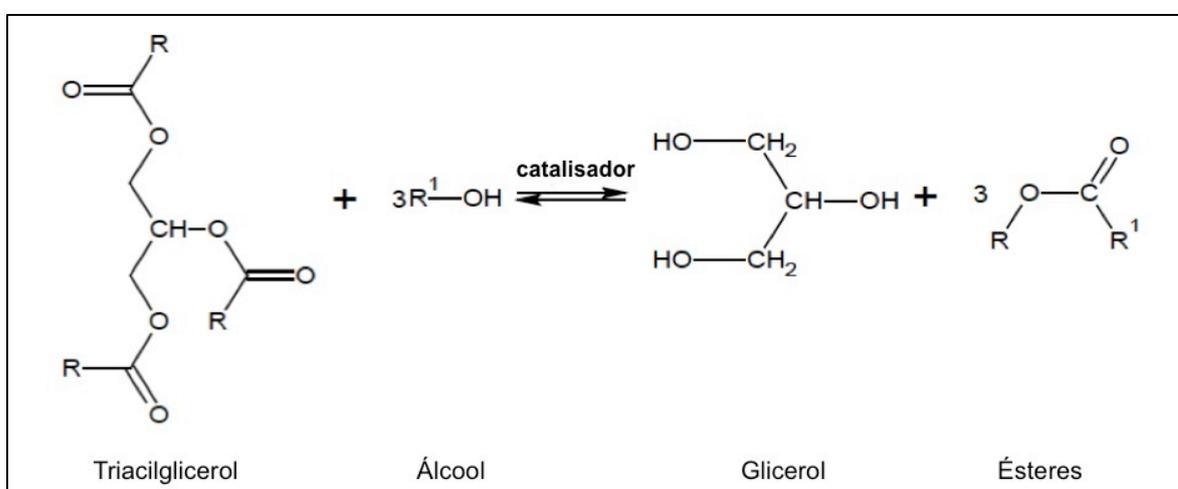


FIGURA 1 - EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

FONTE: Adaptado de Carvalho Junior (2010).

NOTA: "R" representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos; "R¹" representa a cadeia carbônica do álcool reagente.

O processo de transesterificação é afetado pelas condições de reação, a razão molar de álcool para óleo, o tipo de álcool, o tipo e a quantidade de catalisador, o tempo de reação, a temperatura e a pureza dos reagentes (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

Na reação de transesterificação, três mols de ésteres e um mol de glicerol são gerados. Segundo Ramos *et al.* (2011), a razão molar estequiométrica de álcool e óleo na transesterificação é de 3:1 (três mols de álcool para um mol de óleo),

porém, um amplo excesso de álcool, usualmente 6:1 ou 12:1, é utilizado para deslocar o equilíbrio químico a fim de maximizar a produção de ésteres graxos.

O metanol é o álcool predominantemente empregado em todo mundo para a produção de ésteres de ácidos graxos para uso como biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006). Seu uso é mais justificado pela sua maior reatividade. Assim, o teor utilizado na reação é menor e o tempo reacional é mais curto. Isto impacta no custo final do processo. Além disso, o uso do metanol facilita a separação das fases éster e glicerol (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2010). Em algumas regiões, mais notadamente no Brasil, a disponibilidade de matéria-prima e tecnologia permite a produção economicamente viável de etanol por processos fermentativos, resultando em um produto mais barato que o metanol (KNOTHE *et al.*, 2006). O etanol é consideravelmente menos tóxico, é renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade. Porém, uma grande desvantagem do etanol está no fato deste promover uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). O uso de álcoois de cadeia ainda mais longa para a produção de biodiesel também já foi descrito, e foi demonstrado que os ésteres derivados destes álcoois oferecem a vantagem de exibir pontos de congelamento inferiores aos observados nos ésteres metílicos correspondentes. Por outro lado, o alto custo de álcoois de cadeia longa torna o biodiesel deles derivado praticamente inviável para uso comercial (KNOTHE *et al.*, 2006).

Dentre os vários tipos de catalisadores estudados para a reação de transesterificação, os principais exemplos são os hidróxidos e alcóxidos de metais alcalinos e os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e organossulfônicos (SUAREZ *et al.*, 2007). A alcoólise em meio alcalino muito é sensível à presença de ácidos graxos livres, pois estes reagem com a base utilizada como catalisador, levando a formação de sabões que inibem a alcoólise ou diminuem o rendimento do processo (RAMOS, *et al.*, 2011).

A reação de transesterificação realizada pela catálise ácida ocorre de forma mais lenta do que a via alcalina, porém a sua utilização se faz necessária quando altos teores de ácidos graxos livres estão presentes nos glicerídeos (ALVES, 2012). A transesterificação ácida requer condições de trabalho mais enérgicas em relação à alcoólise em meio alcalino. As reações devem ser conduzidas com elevadas razões molares, sendo comum o uso de 30:1. Não o bastante, as reações devem ser

realizadas em temperaturas próximas da temperatura de ebulição do álcool utilizado como agente de transesterificação (RAMOS, *et al.*, 2011).

A síntese do biodiesel também pode ser realizada por catálise heterogênea. Tal estratégia oferece vantagens técnicas e ambientais em relação à catálise homogênea, pois facilita a purificação dos monoésteres alquílicos, permite a reciclagem do catalisador sólido ao longo de sua vida útil e minimiza a geração de efluentes (CORDEIRO *et al.*, 2011). Além disso, a recuperação e purificação do glicerol produzido na alcoólise são consideravelmente simplificadas (RAMOS, *et al.*, 2011), não se produz sabões, por neutralização dos ácidos graxos livres, e tampouco por saponificação dos triacilgliceróis. Entretanto, este sistema requer condições mais drásticas de reação (SILVA-BAUMGÄRTNER, 2011).

Considerando os problemas de saponificação durante a reação de transesterificação, a partir de óleos com altos teores de ácidos graxos livres e a baixa taxa de reação nas reações catalisadas por ácidos, muitas pesquisas têm sido realizadas com catalisadores enzimáticos visando um produto final com melhores qualidades (ALVES, 2012). A maioria das enzimas apresenta bom desempenho em condições suaves de temperatura e pressão, demandando baixo consumo de energia quando comparado a outros processos (MEDEIROS *et al.*, 2013) e os processos enzimáticos são geralmente mais limpos e ecológicos (RIVERA; VILLANUEVA; SANDOVAL, 2009).

2.1.1 Padrões de qualidade

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, objetivando fixar teores limites dos contaminantes que não venham prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Geralmente, a qualidade do combustível pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a qualidade da matéria-prima, a composição em ácidos graxos do óleo vegetal ou gordura animal de origem, o processo de produção, o emprego de outros materiais no processo e parâmetros posteriores à produção (KNOTHE *et al.*, 2006).

O biodiesel comercializado em todo o território nacional deve atender a especificação definida no Regulamento Técnico da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP nº 45, de 25/08/2014), independente da origem do óleo ou gordura, levando em conta que suas características são variáveis. Quando enquadrados nesses limites, o biodiesel poderá ser usado na maioria dos motores modernos sem modificação e manterá o mecanismo, a durabilidade e a confiabilidade do motor (ZUNIGA *et al.*, 2011).

A especificação definida pela ANP (TABELA 1) foi elaborada com base em normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e normas internacionais como a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Comité Européen de Normalisation* (CEN) (DIB, 2010).

TABELA 1 - PADRÕES DE QUALIDADE DO BIODIESEL.

Característica	Limite
Aspecto	Límpido e isento de impurezas
Massa específica a 20 °C	850 a 900 kg.m ⁻³
Viscosidade cinemática a 40 °C	3,0 a 6,0 mm ² .s ⁻¹
Teor de água, máx.	200,0 mg.kg ⁻¹
Contaminação total, máx.	24 mg.kg ⁻¹
Ponto de fulgor, mín.	100,0 °C
Teor de éster, mín.	96,5 % massa
Cinzas sulfatadas, máx.	0,020 % massa
Enxofre total, máx.	10 mg.kg ⁻¹
Sódio + potássio, máx.	5 mg.kg ⁻¹
Cálcio + magnésio, máx.	5 mg.kg ⁻¹
Fósforo, máx.	10 mg.kg ⁻¹
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C	1
Número cetano	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	(*)
Índice de acidez, máx.	0,50 mg KOH.g ⁻¹
Glicerol livre, máx.	0,02 % massa
Glicerol total, máx.	0,25 % massa
Monoacilglicerol, máx.	0,7 % massa

continua

TABELA 1 - PADRÕES DE QUALIDADE DO BIODIESEL.

continuação

Característica	Limite
Diacilglicerol, máx.	0,20 % massa
Triacilglicerol, máx.	0,20 % massa
Metanol e/ou etanol, máx.	0,20 % massa
Índice de iodo	Anotar
Estabilidade à oxidação 110 °C, mín.	8 h

FONTE: Adaptado de ANP (Resolução nº. 45, de 25 de agosto de 2014).

NOTAS: *Limites conforme a Tabela 2.

Algumas propriedades do biodiesel estão relacionadas com a estrutura de suas moléculas, como massa específica, viscosidade cinemática, índice de iodo, fração de destilados, número de cetano, ponto de névoa, ponto de entupimento de filtro a frio e ponto de fluidez (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Com relação à densidade, quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do éster alquílico, maior será a densidade, no entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Como a bomba injetora alimenta o motor com volumes constantes para cada condição de operação, a variação da densidade promove alteração da massa de combustível injetada (ZUNIGA *et al.*, 2011).

Quanto à viscosidade cinemática, os autores Knothe *et al.* (2006), explicam que nos óleos vegetais esta característica é muito superior quando comparada com a viscosidade cinemática de combustíveis convencionais derivados do petróleo. Segundo eles, altas viscosidades causam má atomização do combustível na câmara de combustão do motor, acarretando sérios problemas operacionais como a ocorrência de depósitos em suas partes internas. Sob a perspectiva motora, as características físicas da viscosidade cinemática e do ponto de ignição depõem em favor do biodiesel, porque se aproximam consideravelmente mais das propriedades do diesel mineral do que os óleos vegetais (GUERRA; FUCHS, 2010).

O ponto de entupimento de filtro a frio é definido como a menor temperatura em que 20 mL de óleo passa com segurança através do filtro em um tempo de 60 segundos (KNOTHE, *et al.*, 2006). Em regiões de clima mais frio, as baixas temperaturas provocam o surgimento de cristais no biodiesel (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e perdem sua filtrabilidade (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Segundo Mattos (2012), a solidificação parcial ou a perda de fluidez do biodiesel leva a

problemas de interrupção do fluxo de combustível, com o entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor.

O Brasil, com sua grande extensão territorial, apresenta diferenças climáticas consideráveis entre seus estados, sendo que a Região Sul registra as menores temperaturas do país durante o inverno. A Resolução da ANP n.º. 45, de 25 de agosto de 2014, estabelece limites máximos para o ponto de entupimento de filtro a frio de acordo com os estados brasileiros e a época do ano (TABELA 2).

TABELA 2 - LIMITES DE PONTO DE ENTUPIAMENTO DE FILTRO A FRIO.

	Mês	Unidades da federação		
		SP - MG - MS	GO/DF - MT - ES - RJ	PR - SC - RS
Limite máximo, °C.	Jan	14	14	14
	Fev	14	14	14
	Mar	14	14	14
	Abr	12	14	10
	Mai	8	10	5
	Jun	8	10	5
	Jul	8	10	5
	Ago	8	10	5
	Set	8	10	5
	Out	12	14	10
	Nov	14	14	14
	Dez	14	14	14

FONTE: Adaptado de ANP (Resolução n.º. 45, de 25 de agosto de 2014).

NOTAS: Para os estados não contemplados, o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.

Estudos têm sido realizados na busca de melhorias do fluxo de biodiesel para uso em regiões frias. Por exemplo, Mattos (2012) estudou o efeito de aditivos naturais ao biodiesel e sua interferência no ponto de entupimento de filtro a frio do biodiesel; o limoneno reduziu o ponto de entupimento do biodiesel de óleo de soja em mais de 7 °C e no biodiesel de gordura suína a redução foi de 10 °C, o que significa o ponto de entupimento de filtro a frio em temperatura inferior a 13 °C. Balen (2012) conseguiu melhor desempenho no biodiesel (B100) de óleo de soja com a aplicação de vários aditivos. De acordo com a ANP (2012), é possível, também, usar mais de uma fonte vegetal no mesmo biodiesel. A mamona, por

exemplo, se usada em mistura com outros óleos, agrega propriedades positivas ao produto final, como a redução do ponto de congelamento, sem alterar as especificações exigidas pela ANP. Os autores Macêdo *et al.* (2009) demonstraram que as viscosidades dos biocombustíveis produzidos a partir das misturas dos óleos de mamona e babaçu são mais baixas do que as do biodiesel gerado somente pelo óleo de mamona, respeitando os limites da ANP.

2.1.2 Matérias-primas

Todos os óleos vegetais, enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicéridicos, podem ser transformados em biodiesel (TAPANES *et al.*, 2013). Assim, é possível obter na natureza uma variedade de óleos vegetais com potencial para serem empregados como matéria-prima para a produção de biodiesel. Os autores Tapanes *et al.* (2013) citam algumas espécies vegetais que poderiam ser utilizadas para tal propósito:

(...) poderiam constituir matéria-prima para a produção de biodiesel, os óleos das seguintes espécies vegetais: amendoim, milho, soja, polpa de dendê, amêndoa do coco de dendê, amêndoa do coco da praia, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, baga de mamona, semente de colza, semente de maracujá, semente de pinhão manso, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (TAPANES *et al.*, 2013).

De fato, é possível encontrar na literatura vários trabalhos relacionados à síntese de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias-primas, tais como amêndoa do coco de babaçu (LIMA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2009); semente de maracujá (MELO; ZAMIAN, 2006; TRAJANO *et al.*, 2009; DOMINGUES *et al.*, 2014), polpa de abacate (BUOSI, 2013). Além dos óleos vegetais e gorduras animais, outros materiais como óleos utilizados para a cocção de alimentos (fritura) também são adequados para a produção de biodiesel; no entanto, mudanças no procedimento de reação são frequentemente necessárias devido à presença de água e de ácidos graxos livres (KNOTHE *et al.*, 2006). Gorduras animais, óleos

vegetais hidrogenados e óleos de fritura que contêm gordura de frango apresentam teores mais altos de ácidos graxos saturados que a maioria dos óleos vegetais de clima temperado. Estes ácidos graxos podem causar problemas de estabilidade em baixas temperaturas e de desempenho no motor (KNOTHE *et al.*, 2006).

O componente lipídico da matéria-prima empregada desempenha um papel fundamental nas propriedades do biodiesel. Segundo Singh *et al.* (2014), a alta estabilidade oxidativa aliada à um baixo ponto de entupimento de filtro à frio é preferível para o biodiesel. No entanto, existe uma relação inversa entre alta estabilidade oxidativa (conferido por compostos de maior saturação) e melhores propriedades de fluidez a frio (conferido por compostos de maior insaturação).

De acordo com Singh *et al.* (2014), os principais ácidos graxos constituintes do óleo de soja são os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. No óleo de girassol estes cinco ácidos graxos são os principais constituintes, além de outros ácidos graxos que são encontrados em menor quantidade. Outros óleos vegetais comestíveis apresentam uma constituição similar de ácidos graxos, com pequenas diferenças em suas composições.

A Tabela 3, a seguir, apresenta alguns dos principais ácidos graxos encontrados em óleos e gorduras utilizados e/ou testados como matéria-prima para uso como biodiesel.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA BIODIESEL.

Óleo ou gordura	Composição em ácidos graxos %(m/m)						
	C12:0 láurico	C14:0 mirístico	C16:0 palmítico	C18:0 esteárico	C18:1 oléico	C18:2 linoléico	C18:3 linolênico
Babaçu	40-45	11-27	5,2-11	1,8-7,4	9-20	1,4-6,6	-
Canola	-	-	1,5-6	1-2,5	52-66,9	16,1-31	6,4-14,1
Coco	44-51	13-20,6	7,5-10,5	1-3,5	5-8,2	1,0-2,6	0-0,2
Milho	-	0-0,3	7-16,5	1-3,3	20-43	39-62,5	0,5-1,5

continua

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA BIODIESEL.

continuação

Óleo ou gordura	Composição em ácidos graxos %(m/m)						
	C12:0 láurico	C14:0 mirístico	C16:0 palmítico	C18:0 esteárico	C18:1 oléico	C18:2 linoléico	C18:3 linolênico
Algodão	-	0,6-1,5	21,4-26,4	2,1-5	14,7 -21,7	46,7-58,2	-
Linhaça	-	-	6-7	3,2-5	13-37	5-23	26-60
Azeitona	-	0-1,3	7-20	0,5-5,0	55-84,5	3,5-21	-
Palma	0-0,4	0,5-2,4	32-47,5	3,5-6,3	36-53	6-12	-
Amendoim	-	0-0,5	6-14	1,9-6	36,4-67,1	13-43	-
Colza	-	0-1,5	1-6	0,5-3,5	8-60	9,5-23	1-13
Gergelim	-	-	7,2-9,2	5,8-7,7	35-46	35-48	-
Soja	-	-	2,3-13,3	2,4-6	17,7-30,8	49-57,1	2-10,5
Girassol	-	-	3,5-7,6	1,3-6,5	14-43	44-74	-
Sebo bovino	-	2,1-6,9	25-37	9,5-34,2	14-50	26-50	-

FONTE: Adaptado de Knothe *et al.* (2006).

NOTA: Estes óleos ou gorduras podem conter pequenas quantidades de outros ácidos graxos que não se encontram listados nesta tabela.

2.1.2.1 Microalgas como matéria-prima para biodiesel

As microalgas podem ser convertidas a bio-óleo, bioetanol, biohidrogênio e biometano, por métodos termoquímicos e bioquímicos, e teoricamente são uma fonte muito promissora de biodiesel (DEMIRBAS, 2008). A maioria das microalgas acumulam lipídeos neutros, e, devido ao baixo grau de insaturação, esses lipídeos são essenciais para a produção de biodiesel (RAMARAJ *et al.*, 2015).

Os biocombustíveis produzidos das lavouras tornaram-se uma grande controvérsia devido à competição entre alimentos e combustível. Neste contexto, a produção de biocombustível a partir de microalgas é amplamente aceita (ASHOKKUMAR *et al.*, 2014). Porém, esta é uma aplicação que ainda não se

encontra muito desenvolvida devido aos diversos fatores econômicos e técnicos (ROSA, 2011).

Segundo Chisti (2007), o biodiesel derivado de oleaginosas é uma alternativa renovável potencial, mas as microalgas parecem ser a única fonte de biodiesel renovável capaz de atender à demanda global de combustíveis para transportes, uma vez que sua produtividade de óleo excede em muito a produtividade de óleo das culturas oleaginosas. De acordo com Mousdale (2008), o principal argumento desta afirmação, é o de que a produtividade de óleo da microalga selecionada é muito superior a das melhores sementes de plantas terrestres produtoras de óleo. Além disso, de acordo com Ashokkumar *et al.* (2014), as microalgas têm um curto ciclo de colheita (3-15 dias, dependendo da alga e do processo empregado), o que permite colheitas múltiplas ou contínuas, gerando maior produtividade de biomassa em comparação às culturas convencionais, que são normalmente colhidas uma ou duas vezes em um ano.

Os processos para obter biodiesel a partir de microalgas por transesterificação apresentam diversos gargalos que dificultam sua produção industrial, dentre eles a exigência energética para a extração dos lipídeos e a influência negativa da umidade no rendimento da extração de lipídeos (HIDALGO *et al.*, 2013). A produção de biodiesel de microalgas, assim como a primeira geração de biodiesel, é feita, na maioria das vezes, em dois estágios, o primeiro consiste na extração dos lipídeos e o segundo na produção de biodiesel (HIDALGO *et al.*, 2013). A fim de reduzir o custo da produção de biodiesel de microalgas e aumentar o rendimento em ésteres alquílicos de ácidos graxos, para a biomassa pode-se utilizar a transesterificação *in situ* (MENEZES *et al.*, 2013), que facilita a conversão do óleo para ésteres alquílicos diretamente da biomassa, eliminando assim a etapa de extração requerida para obter a matéria-prima, como é feito no método convencional (EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010). O conceito da transesterificação *in situ* (ou direta) de ácidos graxos nas amostras vem recebendo atenção ao longo dos anos, principalmente devido a redução significativa que esta técnica oferece com relação ao tempo de reação e à quantidade de solvente empregado (LEWIS; NICHOLS; McMEEKIN, 2000). A Figura 2 apresenta um esquema comparativo entre o método convencional de transesterificação e o método da transesterificação *in situ*.

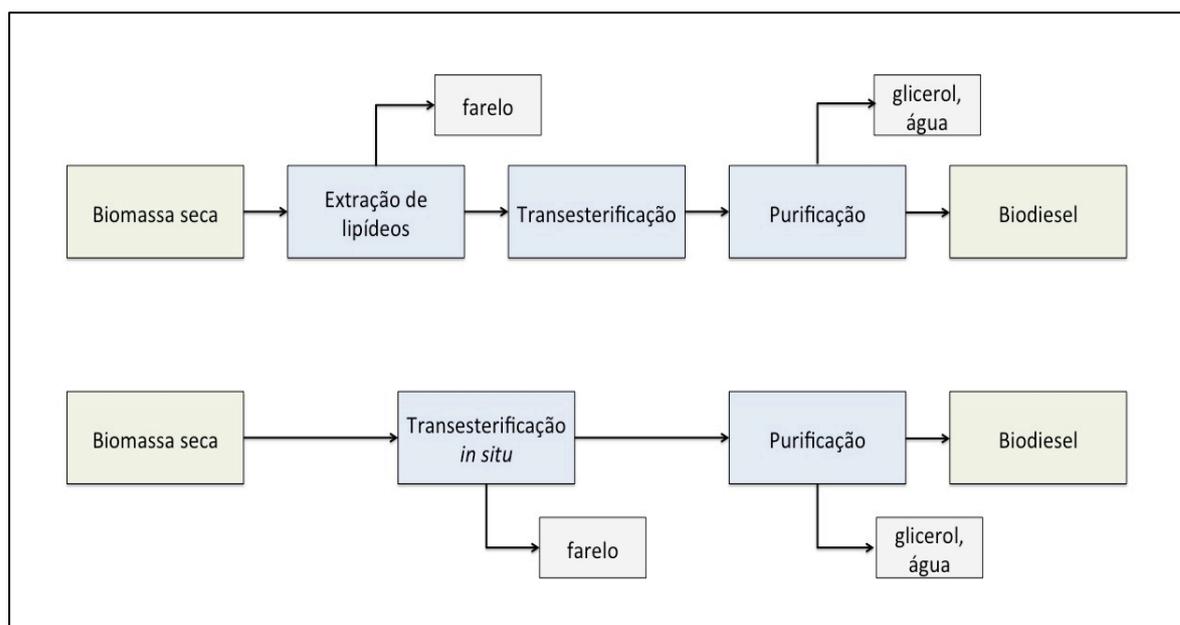


FIGURA 2 - ESQUEMA COMPARATIVO: MÉTODO CONVENCIONAL DE TRANSESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU*.

FONTE: Adaptado de Velasquez-Orta, Lee e Harvey (2012).

A transesterificação *in situ* é amplamente estudada para a produção de ésteres alquílicos diretamente em sementes de oleaginosas como o girassol (HARRINGTON; DARCY-EVANS, 1985; SILER-MARINKOVIC; TOMASEVIC, 1998), pinhão-manso (KASIM, 2012), moringa (AZEVEDO, 2013) e colza (ABO EL-ENIN *et al.*, 2013), além de micro-organismos como a levedura *Lipomyces starkeyi* (REIS, 2013) e o fungo filamentoso *Aspergillus candidus* (KAKKAD *et al.*, 2015).

A alcoólise em meio alcalino é muito sensível à presença de ácidos graxos livres, pois estes reagem com a base utilizada como catalisador, levando à formação de sabões que inibem a alcoólise ou diminuem o rendimento do processo (RAMOS *et al.*, 2011). Assim, devido ao alto teor em ácidos graxos livres do óleo extraído de microalgas, o uso de um catalisador ácido é recomendável para a obtenção de ésteres alquílicos a partir desta matéria-prima (CARVALHO JUNIOR, 2010; LEMÕES, 2011).

2.1.3 Os cenários global e brasileiro

Os biocombustíveis vêm se tornando uma excelente fonte de energia alternativa ao petróleo. Eles são cada vez mais importantes no cenário global, principalmente por se tratarem de uma produção mais sustentável de energia. Neste contexto, países como o Brasil têm um papel fundamental, na produção dessa energia renovável (OLIVEIRA; ZANIN, 2015).

De acordo com o relatório da *Merchant Research and Consulting Ltd.*, durante a última década o mercado global de biodiesel mostrou um incrível crescimento, com um aumento no volume de produção e demanda de quase sete vezes entre os anos de 2005 e 2013 (MCGROUP, 2014).

Em 2013, o maior produtor mundial de biodiesel foram os Estados Unidos com aproximadamente 5,1 milhões de m³, seguidos de Alemanha, Brasil, Argentina e França (MME, 2014b). O *ranking* mundial e a produtividade nos anos de 2012 e 2013 estão disponíveis na Figura 3.

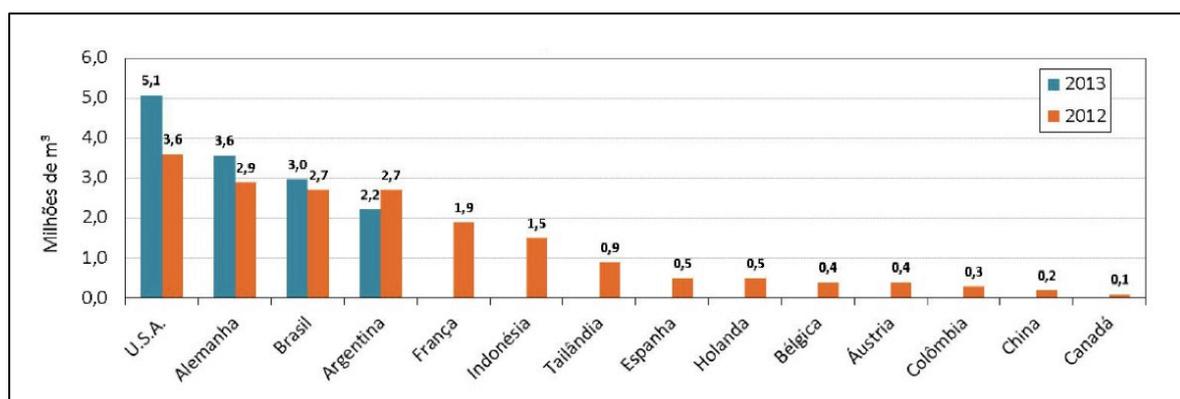


FIGURA 3 - PRODUÇÃO MUNDIAL DE BODIESEL 2012-2013.
FONTE: MME (2014b).

Em 2013, foi observada uma forte elevação no consumo de biodiesel nos Estados Unidos, com incremento de 35%. No Brasil, o crescimento na demanda de biodiesel foi de 7,4%. A Argentina, um dos principais produtores mundiais de biodiesel, manteve seu consumo interno estável (MME, 2014b). Na União Europeia (UE), a Alemanha e a França são líderes na produção de biodiesel regional; outros produtores principais incluem Polônia, Holanda e Itália (MCGROUP, 2014).

O Brasil é pioneiro na América Latina no que diz respeito ao uso de biocombustíveis. A Lei nº. 737 de 1938 e, posteriormente, a Lei nº. 723 de 1993, versam sobre a obrigatoriedade do uso de etanol misturado à gasolina (RAMOS *et al.*, 2011). A produção de álcool, através do Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool), apresentou-se como uma opção nacional interessante para afastar a ameaça do desabastecimento e também por ser um substituto energético simples, econômico e gerador de empregos (GEHLING, 2007).

Da mesma forma, a produção e o consumo de biodiesel no Brasil foram determinados por meio da Medida Provisória nº. 214/2004, convertida na Lei nº. 11.097/05. Essa lei, contida no PNPB, pode ser considerada como um marco na história do biodiesel no Brasil, uma vez que é a partir dela que o biodiesel encontra sustentáculo jurídico na legislação brasileira (TAPANES *et al.* 2013).

A partir de 2008 a mistura de biodiesel puro ao óleo diesel passou a ser obrigatória. Entre janeiro e junho de 2008 a mistura foi de 2%, entre julho de 2008 e junho de 2009 foi de 3% e entre julho e dezembro de 2009 foi de 4% (MME, 2013). Em 2005, a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) regulamentou a permissão de comercialização de diesel com 5% de biodiesel, proporcionando um incentivo à sua produção (FREITAS; THOMÉ; BOUDEAUX-REGO, 2013). Com a Medida Provisória nº. 647, de 28 de maio de 2014, foram estabelecidos os percentuais de adição de 6%, a partir de 01 de julho de 2014, e de 7% a partir de novembro de 2014 (BRASIL, 2014). De acordo com a Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil (APROBIO, 2014), em 2015, com o B7, a produção pode chegar a 4,3 bilhões de litros. Este aumento pode devolver ao país a segunda colocação no *ranking* mundial de produção, atrás dos Estados Unidos.

O Boletim Mensal do Biodiesel, divulgado pela ANP (2015), apresenta o perfil nacional das matérias-primas para a produção de biodiesel para o mês de maio de 2015 (FIGURA 4), demonstrando o domínio da cultura da soja, responsável por 80,79% do biodiesel produzido no Brasil, seguida da gordura bovina com 15,82% da produção.

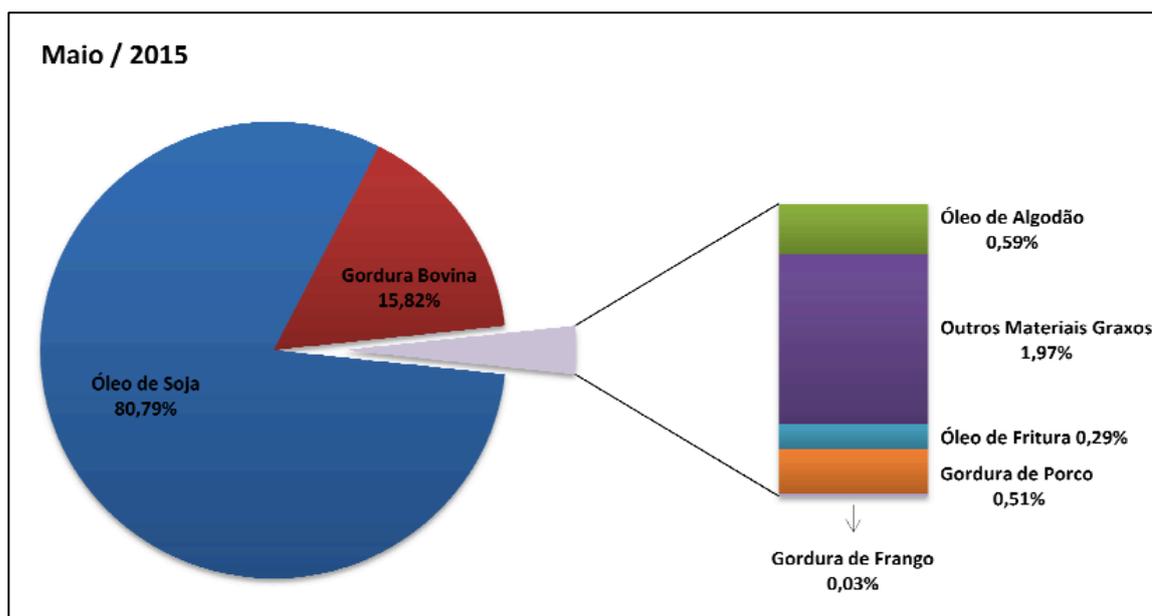


FIGURA 4 - MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL: PERFIL NACIONAL COM BASE NO MÊS DE MAIO DE 2015.
 FONTE: ANP (2015).

Segundo Franco, Lôbo e Cruz (2013), o histórico da produção brasileira de biodiesel mostra que o setor está em crescente dependência de uma única matéria-prima, a soja, contrapondo-se ao objetivo do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) de sustentar sua cadeia na diversidade de materiais graxos disponíveis nas várias regiões do País. De fato, esta informação é consolidada pelos dois últimos relatórios do Balanço Energético Nacional (BEN) - anos base 2012 e 2013 (MME, 2013; 2014a), os quais apontam o óleo de soja como a principal matéria-prima usada para a produção de biodiesel no país, com uma parcela representativa com cerca de dois terços frente às demais matérias-primas.

2.2 MICROALGAS

Existem aproximadamente 30.000 espécies de algas no mundo, que têm um papel fundamental na oxigenação de ambientes aquáticos e são componentes da cadeia alimentar marinha. As microalgas aquáticas podem viver suspensas na massa d'água formando o fitoplâncton (GUERRA *et al.*, 2011).

A divisão ou filo Chlorophyta compreende o maior grupo de algas com maior diversidade de tipos morfológicos, formas de reprodução, habitat. São conhecidos cerca de 550 gêneros com aproximadamente 17000 espécies. Cerca de 90% das clorófitas são microalgas unicelulares ou coloniais, com formas planctônicas e bentônicas (GUERRA *et al.*, 2011).

Segundo Bicudo e Menezes (2006), os representantes do gênero *Chlorella* habitam principalmente o plâncton de sistemas de águas paradas ou quase, dos tipos lagos e reservatórios, mas também podem ser coletados do solo, de ambientes subaéreos e do interior de protozoários ciliados.

O trabalho de Nogueira¹ (1999, citado por BICUDO; MENEZES, 2006) identifica quatro espécies (*C. homosphaera*, *C. minutíssima*, *C. oocystoides* e *C. vulgaris*) que ocorrem na represa Samambaia, no estado de Goiás. Indivíduos do gênero *Chlorella* foram identificados por Palmer² (1960, citado por RODRIGUES, 2008) em pontos próximos à captação de água do Rio Grande. Ortiz-Rico (2014) identificou 15 espécies de microalgas a partir de uma mescla de microalgas coletada do lago do Passeio Público, no município de Curitiba-PR.

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes de grande importância, uma vez que sintetizam biocompostos de alto valor agregado (FERREIRA; SOUZA-SOARES; COSTA, 2013). A imensa biodiversidade e consequente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgais, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas (DERNER *et al.*, 2006).

De acordo com Ortiz-Rico (2014), extensas coleções de microalgas têm sido criadas por pesquisadores nas últimas décadas. Um exemplo, é a coleção de microalgas de água doce da Universidade de Coimbra (Portugal) com mais de mil espécies, tem sido disponibilizada a fim de avaliar aplicações que envolvem a indústria farmacêutica, alimentar, a produção de biocombustíveis, entre outras.

As microalgas estão sendo cada vez mais cultivadas e utilizadas como fonte de proteínas, vitaminas, sais minerais e outros produtos. Dentre essas, destacam-se a cianobactéria *Spirulina* e as clorófitas *Dunaliella* e *Chlorella* (GUERRA *et al.*,

¹ NOGUEIRA, I. S. **Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica da represa Samambaia, Goiás, Brasil.** 1999, 341p. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

² PALMER C. M. Algas e suprimento de água na área de São Paulo. **Rev. Dpto. Água Esg.**, 21, p.11-15, 1960.

2011). De acordo com os autores Campos, Barbarino e Lourenço (2010), as possíveis aplicações estão diretamente relacionadas à taxa de crescimento e ao perfil químico das espécies. Assim, a seleção de condições que promovam o aproveitamento da biomassa algácea é fundamental para sua utilização econômica.

As aplicações ambientais das microalgas incluem a biofixação de CO₂, remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis e produção de moléculas de origem lipídica com capacidade surfactante (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

Os autores Campos, Barbarino e Lourenço (2010), avaliaram o crescimento e a composição química de várias espécies de microalgas e observaram diferenças na velocidade de crescimento e ampla variação nos teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos fotossintetizantes, sendo as proteínas as substâncias mais abundantes. Segundo os autores, as concentrações de carboidratos e lipídeos foram mais baixas se comparadas com os dados da literatura sobre composição química de microalgas na fase estacionária de crescimento, o que deve ter sido consequência da grande disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura, conduzindo as espécies a apresentarem elevada produção de proteínas e menor síntese de carboidratos e lipídeos.

2.2.1 Sistemas de produção

De acordo com Azeredo (2012), existem diversos tipos e sistemas para a produção de biomassa de microalgas, que podem ser divididos em: sistemas autotróficos, que utilizam a luz do sol como principal fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono para o crescimento das microalgas; sistemas heterotróficos, que se valem de compostos orgânicos como principal fonte de energia e carbono para o desenvolvimento da cultura; e, por último, sistemas mixotróficos que apresentam duas fases, uma autotrófica e outra heterotrófica.

2.2.1.1 Produção autotrófica

Microalgas autotróficas são completamente dependentes de seu aparato fotossintético para suprir suas necessidades metabólicas, usando luz solar como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono, para produzir carboidratos e adenosina trifosfato (ATP) (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Os sistemas de produção do tipo autotrófico foram os primeiros a serem criados e, portanto, são os mais difundidos atualmente (AZEREDO, 2012). Um aspecto bastante positivo neste tipo de cultivo é o uso de CO₂ resultante de processos industriais, o que representa uma forma de mitigação das emissões de gases de efeito estufa, além da diminuição dos custos de produção da biomassa microalgal (FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013).

- Sistemas abertos

Os sistemas abertos para o cultivo de microalgas são os mais empregados atualmente, pois oferecem condições naturais de crescimento, tais como temperatura, luminosidade e qualidade do ar. Por outro lado, apresentam como desvantagem o maior risco de contaminação, visto que não fazem o uso de um sistema de controle eficiente, sendo introduzidas de forma inevitável espécies indesejáveis, reduzindo assim o rendimento do processo (VIÊGAS, 2010; FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013; LOPES *et al.*; 2014). Os tanques são, geralmente, construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, com fundo de terra ou revestido com material plástico, podendo ser simples (FIGURA 5), circulares (FIGURA 6) ou *raceway* (FIGURA 7). Os tanques circulares e *raceway* são providos de aparato mecânico para a mistura da cultura (DERNER *et al.*, 2006; FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013; SCHROEDER, 2013; LOPES *et al.*, 2014). Os sistemas abertos são considerados os mais rentáveis, uma vez que pode ser utilizado para o tratamento de águas residuárias de fontes distintas, diminuindo os custos nutricionais requeridos pelo cultivo, podendo alcançar alta concentração celular e produtividade por hectare (HERNÁNDEZ-PEREZ; LABBÉ, 2014).

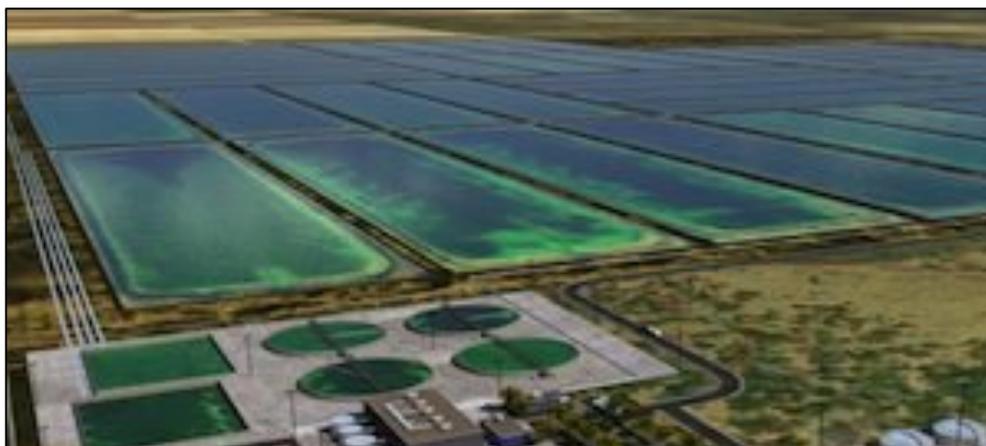


FIGURA 5 - CULTIVO EM LAGOAS.
FONTE: Transformative (2010).



FIGURA 6 - CULTIVO EM TANQUES CIRCULARES.
FONTE: Sun Chlorella Corporation (2008).



FIGURA 7 - CULTIVO EM TANQUES RACEWAY.
FONTE: NanoVoltaics, Inc. (2014).

- Sistemas fechados

O termo "fechado" diz respeito ao menor contato com o ambiente externo que estes sistemas apresentam em relação aos tanques. Os sistemas fechados são comumente denominados fotobiorreatores e geralmente são utilizados para produção em larga escala, gerando produtos de alto valor comercial (FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013). Os fotobiorreatores são classificados em tubulares (FIGURA 8) e planares (FIGURA 9), de acordo com a geometria do compartimento que encerra a cultura. Assim, são constituídos de tubos ou placas de material transparente à luz visível, podendo ser de plástico, vidro ou policarbonato (DERNER *et al.*, 2006; FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013) e possuem uma seção que permite a troca de gases no meio de cultura, entrada de CO₂ e saída de O₂ (LOPES *et al.*, 2014).



FIGURA 8 - FOTOBIORREATOR TUBULAR.
FONTE: Enderle (2013).



FIGURA 9 - FOTOBIORREADORES DE PLACAS PLANAS.
FONTE: NanoVoltaics, Inc. (2014)

2.2.1.2 Produção heterotrófica

As microalgas heterotróficas não necessitam de luz para crescer. Entretanto são dependentes de fonte de energia e de carbono orgânico, como a glucose e o acetato (BUMBAK *et al.*, 2011; AZEREDO, 2012).

Por não estarem sujeitas às limitações de luz, a cultura de algas heterotróficas apresenta a vantagem de crescimento rápido, além de poder ser realizada em recipientes grandes e atingir altas concentrações de biomassa, o que leva à uma redução nos custos do processo de recuperação da biomassa, que representam grande parte dos custos totais de produção em outros sistemas (AZEREDO, 2012).

De modo geral, o cultivo heterotrófico é mais barato, as instalações são mais simples para construir e mais fácil de manter em larga escala quando comparado ao cultivo autotrófico (PEREZ-GARCIA, 2011). Porém, de acordo com Franco, Lôbo e Cruz (2013), no modo heterotrófico somente algumas microalgas são capazes de crescer sem que seja feita alguma manipulação genética.

2.2.1.3 Produção mixotrófica

O regime de crescimento mixotrófico é variante do regime de crescimento heterotrófico, onde o CO₂ e o carbono orgânico são assimilados tanto pelo metabolismo respiratório quanto pelo metabolismo fotossintético simultaneamente. Algumas mixotróficas são principalmente fotossintéticas e apenas ocasionalmente usam uma fonte de energia orgânica. Outras espécies de microalgas não são verdadeiramente mixotróficas, mas possuem a habilidade de alternar entre os metabolismos heterotrófico e fototrófico, dependendo das condições do ambiente em que se encontram (KAPLAN *et al.*, 1986³ citados por PEREZ-GARCIA, 2011; BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

³ KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. ALGAL NUTRITION. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook for Microalgal Mass Culture. **CRC Press**, Boca Raton, FL., USA, p.147e198, 1986.

2.2.2 Tecnologias de colheita da biomassa

O custo da produção de biomassa é o principal gargalo para a comercialização em grande escala de biocombustíveis de microalgas. Em particular, a etapa de colheita, que desempenha um papel-chave no processo (VANDAMME, 2013; MILLEDGE; HEAVEN, 2013). Os custos desta etapa podem representar cerca de 20-30% do total do processo produtivo (GRIMA *et al.*, 2003), pois requer a separação de uma pequena quantidade de biomassa, que consiste em pequenas células individuais (1 e 100 μm), a partir de um grande volume de meio de cultura (VANDAMME; FOUBERT; MUYLEAERT, 2013; LUO; FANG; SMITH JR, 2013).

As algas podem ser colhidas por uma série de métodos; sedimentação, floculação, flotação, filtração e centrifugação ou uma combinação de qualquer um destes (MILLEDGE; HEAVEN, 2013), por exemplo, a separação do meio líquido em escala comercial por centrifugação, sendo que a floculação e a flotação podem ser usadas como métodos coadjuvantes (FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013). Não existe um método de recuperação de biomassa que seja adequado para todos os sistemas de produção. Logo, a seleção da tecnologia mais adequada e a otimização do processo são cruciais tanto do ponto de vista econômico quanto do técnico-operacional (AZEREDO, 2012; MILLEDGE; HEAVEN, 2013).

A eficiência da maioria dos sistemas de colheita de microalgas pode ser melhorada por meio de tratamentos preliminares, que se destinam a desestabilizar a suspensão para promover a formação de flocos (OMETTO, 2014). A floculação é considerada um processo eficaz de colheita em larga escala de culturas de microalgas (WU *et al.*, 2012b). De acordo com Gouveia (2011), as microalgas apresentam, em sua superfície, uma carga negativa que as previnem de serem agregadas à partículas suspensas. Esta carga superficial pode ser combatida pela adição de químicos conhecidos como floculantes. Tipos de floculantes podem incluir $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (sulfato de alumínio), FeCl_3 (cloreto de ferro) e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (sulfato de ferro).

A floculação pode ser conduzida também através da alteração de pH da suspensão de microalgas. Neste processo, o aumento do pH promove a precipitação de sais de cálcio e/ou magnésio. Durante a precipitação, os sais cristalizados reúnem as células algáceas melhorando o processo de sedimentação (SHELEF; SUKENIK; GREEN, 1984; GREGORY; DUAN, 2001). Microalgas também

apresentam a tendência para a autofloculação. O processo é sensível ao pH, que aumenta com o consumo de CO₂ dissolvido (DIFUSA; HOHANTY; GOUD, 2015).

Os autores Wu *et al.* (2012b) avaliaram a colheita de várias espécies de microalgas através da floculação induzida por aumento no pH do meio utilizando NaOH. O aumento do pH aumentou a eficiência da floculação em até 90% para microalgas de água doce (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.*). De forma semelhante, Huo *et al.* (2014) avaliaram a floculação alcalina para a colheita da microalga verde de água doce *Scenedesmus quadricauda* #507 e da diatomácia marinha *Chaetoceros muelleri* #862, atingindo atividade máxima de floculação de 94,7% (pH=11,6) e 100% (pH=11,5), respectivamente, sem dano morfológico aparente para as espécies.

A separação sólido-líquido por sedimentação é uma das formas mais simples de colheita de microalgas. A separação é causada por forças gravitacionais e está baseada na Lei de Stokes, a qual determina características de sólidos suspensos pela densidade, taxa e velocidade de sedimentação das células. Este é um método muito comum de colheita de microalgas em sistemas de tratamento de águas residuais e em unidades de produção de biomassa de microalgas como alimento para a aquicultura (SHELEF; SUKENIK; GREEN, 1984; AZEREDO, 2012; VANDAMME, 2013).

A centrifugação é uma extensão da sedimentação por gravidade na medida em que a aceleração gravitacional é substituída pela aceleração centrífuga (AZEREDO, 2012). Centrífugas podem processar grandes volumes de forma relativamente rápida e a biomassa pode permanecer totalmente retida durante a recuperação (GRIMA *et al.*, 2003). De acordo com Azeredo (2012), do ponto de vista técnico e operacional, a centrifugação é um método bastante recomendado para a recuperação de biomassa em sistemas de produção de microalgas por ser rápido e confiável, apresentando características ideais para a produção em larga escala. Entretanto, no tocante ao custo de operação e de aquisição das centrífugas, esse método não é recomendado para uma etapa inicial onde a concentração é baixa, representando um alto custo operacional.

Processos de filtração consistem na separação da fase sólida da fase líquida, passando a mistura através de um meio filtrador onde os sólidos são retidos (AZEREDO, 2012). Na filtração não há necessidade da adição de químicos como coagulantes, permitindo assim a reutilização da água carregada com nutrientes. No

entanto, a técnica envolve consumo de energia para manter a diferença de pressão intermembrana e as membranas devem ser substituídas periodicamente. Outras dificuldades encontradas na filtração por membranas incluem incrustações devido à diferença na forma, tamanho, e a compressibilidade da matéria orgânica (SINGH *et al.*, 2014). Neste sistema, o tamanho das algas é um fator importante, pois os procedimentos de filtração de baixo custo são atualmente aplicáveis apenas para a colheita de microalgas maiores (SHELEF; SUKENIK; GREEN, 1984).

Os métodos de flotação são baseados na separação por gravidade pela qual o ar, ou gás, é borbulhado através da suspensão sólido-líquido e as moléculas gasosas são ligadas às partículas sólidas (CHEN *et al.*, 2011). A técnica mais aplicada é a flotação por ar dissolvido, onde ar pressurizado é injetado em uma suspensão de microalgas pré-floculada e micro bolhas de ar ($\leq 500 \mu\text{m}$) ligam-se aos flocos carregando-os para a superfície (OMETTO, 2014; DIFUSA; HOHANTY; GOUD, 2015). Outra técnica é a eletroflotação, um processo que envolve a aplicação de um campo elétrico para separar a microalga. Bolhas de hidrogênio são formadas durante a eletrólise. As bolhas produzidas aderem aos flocos de microalgas carregando-os para a superfície. Dependendo da configuração do sistema, os eletrodos podem ser colocados horizontalmente ou verticalmente (OMETTO, 2014; DIFUSA; HOHANTY; GOUD, 2015).

2.2.3 Tecnologias de extração de lipídeos

As microalgas apresentam o potencial de acumular lipídeos rapidamente em suas células, como os triacilgliceróis. No entanto, os métodos de extração de lipídeos os para as células de microalgas não estão bem estabelecidos, e atualmente não existe qualquer método de extração específico para determinar o teor de ácido graxo de microalgas (LI *et al.*, 2014). As mais importantes técnicas para a extração de lipídeos são pelo uso de solventes químicos, CO₂ supercrítico e métodos físico-químicos (RAMARAJ *et al.*, 2015).

O óleo de microalgas pode ser extraído pelo uso de solventes, como o n-hexano, clorofórmio, benzeno, éter etílico e etanol, sendo o n-hexano o mais utilizado (RAMARAJ *et al.*, 2015). A eficiência da extração dos lipídeos está amplamente relacionada à polaridade do solvente, ou mistura destes. Geralmente,

misturas contendo um solvente polar e outro apolar podem extrair um maior montante de lipídeos. Por exemplo, uma combinação de clorofórmio (apolar), metanol (polar) e água, conhecido como método Bligh & Dyer, tem sido empregada para a extração lipídica em uma ampla gama de amostras biológicas (LI *et al.*, 2014). A vantagem de se usar solventes para a extração lipídica se deve pelo fato de serem menos dispendiosos e muito eficientes. Para a separação de outros produtos de valor, como o β -caroteno, astaxantina e outros ácidos graxos essenciais, de microalgas, a extração por solventes é amplamente empregada (GRIMA *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a tecnologia de fluido supercrítico tem sido adotada para extração de óleo de microalgas, especialmente para produtos farmacêuticos e bioprodutos nutracêuticos. Para a extração dos lipídeos de microalgas, CO₂ é primeiramente aquecido e depois comprimido até atingir seu ponto crítico (31,1 °C; 7,3 MPa) (LI *et al.*, 2014; KANDA *et al.*, 2015; RAMARAJ, *et al.*, 2015). Para isso, é necessário o uso de um aparato especial que suporte a alta pressão do CO₂ supercrítico (KANDA *et al.*, 2015). Esta técnica oferece várias vantagens quando comparado ao uso de solventes líquidos, tais como a não toxicidade, a não oxidação ou degradação térmica dos extratos e a fácil separação dos produtos de interesse (LI *et al.*, 2014). Dentre as desvantagens estão o alto custo dos equipamentos e o alto gasto energético para alcançar as altas pressões (RAMARAJ, *et al.*, 2015).

Métodos físico-químicos para a extração de lipídeos envolvem o rompimento celular e posterior extração dos ácidos graxos. Dentre as técnicas, podem ser usados microondas, autoclave e sonificação (RAMARAJ, *et al.*, 2015). Na extração assistida por microondas, estas induzem a vibração das moléculas de água no interior da célula, que causam o aumento da temperatura dos líquidos intracelulares e a evaporação da água, que exerce pressão sobre a parede celular, rompendo-a, liberando os conteúdos intracelulares (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015). No caso do ultrassom, ondas sonoras migram através do meio e induzem variações de pressão. A cavitação acústica gerada cresce e colapsa, transformando as ondas sonoras em energia mecânica que causam o rompimento da célula (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015). No entanto, a maioria dos casos ainda requer alta temperatura, tempos longos ou insumos energéticos elevados (YANG *et al.*, 2014).

2.3 O SISTEMA PARA TRATAMENTO DE EMISSÕES GASOSAS

Visando minimizar o problema de odor causado pela emissão de fumaça gerada pelas atividades de seu estabelecimento, o proprietário de uma churrascaria de Curitiba-PR, procurou os pesquisadores do TECPAR (Instituto de Tecnologia do Paraná) e da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) em busca de uma tecnologia capaz de manter os níveis de emissões gasosas das chaminés dentro dos limites estabelecidos pela legislação ambiental. A solução proposta pelos pesquisadores foi o de um sistema de tratamento biológico que utiliza microalgas para filtrar o efluente gasoso (FIGURA 10).

O primeiro estudo relacionado a este sistema foi realizado por D'Aquino e Schroeder (2009), com a proposta de construir e implementar um fotobiorreator para cultivo de microalgas, utilizando materiais e métodos de baixo custo. O modelo escolhido foi um fotobiorreator semiaberto de placas planas adaptadas com chicanas para aumentar o tempo de retenção da cultura dentro do equipamento.

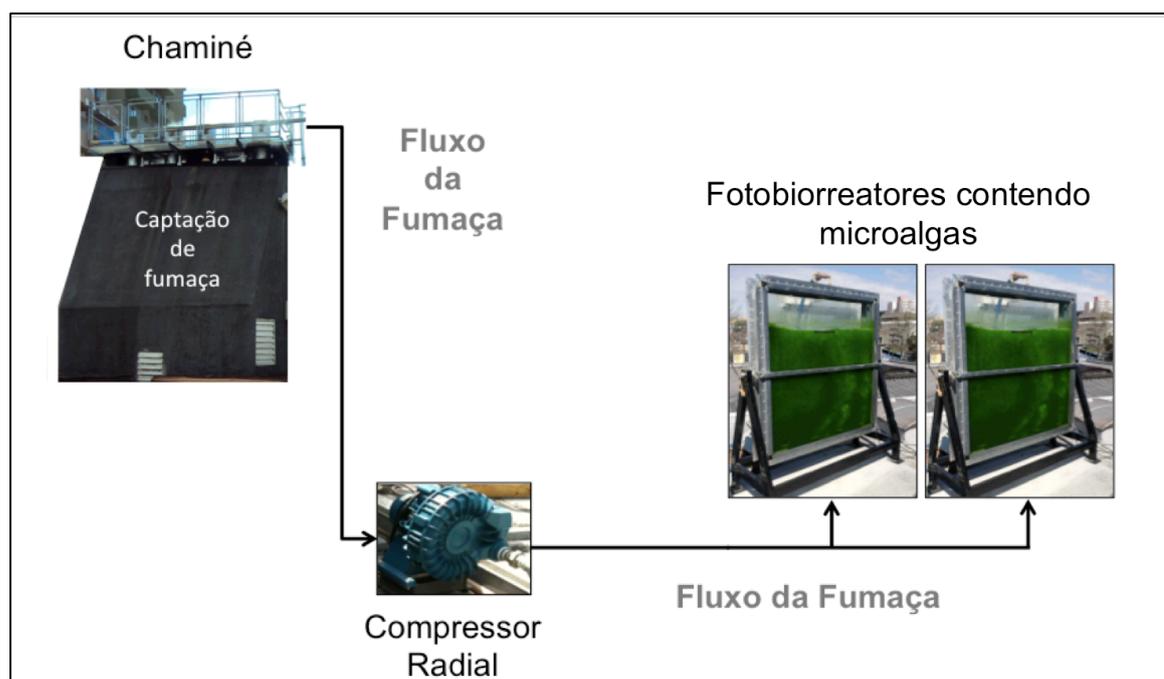


FIGURA 10 - SISTEMA PARA TRATAMENTO E APROVEITAMENTO DE FUMAÇA EM FOTOBIORREATORRES CONTENDO MICROALGAS.
FONTE: TECPAR (2012).

O sistema piloto é constituído por dois fotobiorreatores de placas planas, com 512 L (litros) de capacidade cada um, onde as microalgas são mantidas em meio nutritivo. A emissão captada das chaminés é direcionada e injetada (borbulhada) nos fotobiorreatores, sendo consumida pelas microalgas por meio de seu metabolismo autotrófico. Assim, a emissão, ao invés de ser lançada na atmosfera, é aproveitada como suplemento nutricional para as microalgas. Como consequência, ocorre o crescimento da população de microalgas no sistema, gerando biomassa, que pode ser convertida em produtos com valor agregado. De acordo com Michelin (2014), inicialmente, o sistema tinha por finalidade executar o tratamento de 10% da fumaça lançada na atmosfera. Depois de instalado, o projeto piloto mostrou-se eficiente para tratar 30% do material que é emitido. Segundo Töws (2013), tal sistema representa a busca por soluções para o problema de emissões de odores e fumaça de atividades comerciais tais como churrascarias, pizzarias, padarias, etc., adequando-se assim à legislação ambiental aplicável à atividade.

Para a caracterização da emissão gasosa quanto aos constituintes orgânicos e inorgânicos, Mikami (2011) solicitou análises dos laboratórios de Química Ambiental do TECPAR (Instituto de Tecnologia do Paraná) e do SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial), respectivamente (TABELA 4).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS GASES INORGÂNICOS PRESENTES NA FUMAÇA DA CHAMINÉ DA CHURRASCARIA DEVON'S.

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
CO	1669,1	mg.Nm ³	
CO₂	0,6	%	Analizador de gases
NO	6,9	mg.Nm ³	
NO_x	10,9	mg.Nm ³	
NO₂	3,9	mg.Nm ³	Analizador de gases
SO_x	0,0	mg.Nm ³	
O₂	19,7	%	
Vazão de gás da chaminé	1292,00	mg.Nm ³	Coletor isocinético
Temperatura	97,8	°C	
Umidade	5,4	%	
Material Particulado	51,23	mg.Nm ³	Gravimétrico

FONTE: Ortiz Rico (2014).

A água usada nos fotobiorreatores provém do poço semi-artesiano do próprio estabelecimento e sua caracterização física e química (TABELA 5) foi realizada por Ortiz Rico (2014).

TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA UTILIZADA NOS FOTOBIORREACTORES.

Parâmetro	Resultados	VPM	Unidade
Dureza Total	110,0	500,0	mg.L ⁻¹ CaCO ₃
Nitrato	<0,50	10,0 (como N)	mg.L ⁻¹ N-NO ₃
Nitrito	<1,0	<1,0	mg.L ⁻¹ N-NO ₂
Cloretos	53,2	250,0	mg.L ⁻¹ L Cl -
pH	9,43	6,0-9,5	U pH
Turbidez	<1,0	5 UNT	UNT
Cor	<1,0	10Hz ou mg Pt.L ⁻¹	Hz
Sulfatos	<1,0	250,0 mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹ SO ₄
Sólidos Dissolvidos Totais	240,0	1000,0 mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
Fluoretos	<1,0	1,5 mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹ F-
Alcalinidade Total	125,0	Não consta	mg.CaCO ₃
Manganês	0,07	0,1	mg.L ⁻¹ Mn
Sílica Total	161,7	Não consta	mg.L ⁻¹ SiO ₂
Odor	Nenhum	-	-
Aspecto	Límpido	-	-

Nota: VPM: Valor Máximo permitido pela legislação vigente: Portaria n.518 de 2004.

FONTE: Ortiz-Rico (2014).

Inicialmente, as microalgas utilizadas como inóculo foram captadas no lago do Passeio Público de Curitiba (MIKAMI, 2011). As microalgas foram reisoladas e os táxons presentes na cultura foram identificados por Ortiz-Rico (2014), que denominou o grupo como Mescla Devon's (TABELA 6). Além da identificação das espécies de microalgas presentes neste consórcio, a autora ainda estudou sua cinética de crescimento paralelamente a uma cultura de *Desmodesmus subspicatus*. O estudo revelou que as microalgas constituintes do consórcio M. Devon's apresentaram melhor adaptação ao sistema do que a *D. subspicatus*, atingindo maiores concentrações em peso seco em menor tempo.

TABELA 6 - MICROALGAS CONSTITUINTES DA MESCLA DEVON'S.

Linhagem	Microalga
1	<i>Chlorella sorokiniana</i>
2	<i>Chlorella sp.</i>
3	<i>Chlorella vulgaris</i>
4	<i>Chlorococcum sp</i>
5	<i>Closteridium sp</i>
6	<i>Monoraphidium arcuatum</i>
7	<i>Monoraphidium circinale</i>
8	<i>Monoraphidium contortum</i>
9	<i>Pediastrum duplex</i>
10	<i>Scenedesmus acuminatus</i>
11	<i>Scenedesmus dimorphus</i>
12	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
13	<i>Scenedesmus subspicatus</i>
14	<i>Schroedeira indica</i>
15	<i>Selenastrum westii</i>

FONTE: Ortiz-Rico (2014).

Os fotobiorreatores foram reinoculados em 10 de janeiro de 2014 (PEGORARO, 2014; 2015), mas desta vez, com uma linhagem axênica de *Chlorella vulgaris*, cedida pelo Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável/Universidade Federal do Paraná (NPDEAS/UFPR). O inóculo foi previamente preparado nas instalações do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). De acordo com Pegoraro (2014), apesar da capacidade dos fotobiorreatores ser de 512 L, o volume utilizado é de somente 400 L, pois, quando cheios completamente, produzem muita espuma⁴, extravasando pela parte superior. O inóculo foi preparado a partir de uma quantidade de 10% de suspensão de microalgas, considerando o volume utilizado no fotobiorreator, ou seja, 40 L de suspensão de microalgas para um volume de 360 L de meio Chu (TABELA 7).

⁴ Camada de materiais que flutuam superficialmente nos reatores, sendo constituída por compostos pouco densos, de difícil degradação e insolúveis em água (CHERNICHARO, 1997; MOEN, 2003; SOUZA, 2006).

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU.

Solução	Reagente	Fórmula	Massa.L ⁻¹
1	Nitrato de sódio	NaNO ₃	25 g
2	Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g
3	Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
4	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	7,5 g
5	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	17,5 g
6	Cloreto de sódio	NaCl	2,5 g
7	Titriplex III	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	50 g
	Hidróxido de potássio	KOH	31 g
8	Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98 g
9	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11,42 g
10	Sulfato de zinco heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 mg
	Cloreto de manganês tetrahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 mg
	Óxido de molibdênio	MoO ₃	0,71 mg
	Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 mg
	Nitrato de cobalto hexahidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 mg

FONTE: Knie e Lopes (2004).

Colheitas de microalgas são realizadas periodicamente (até duas vezes por semana) por eletroflotação (PEGORARO, 2015) em um equipamento desenvolvido por Michelin (2013). O eletroflotador é constituído por uma câmara eletrolítica com capacidade de 60 L, uma válvula de escoamento instalada a 5 cm da base, e dois eletrodos de alumínio fixados no fundo do recipiente (FIGURA 11).

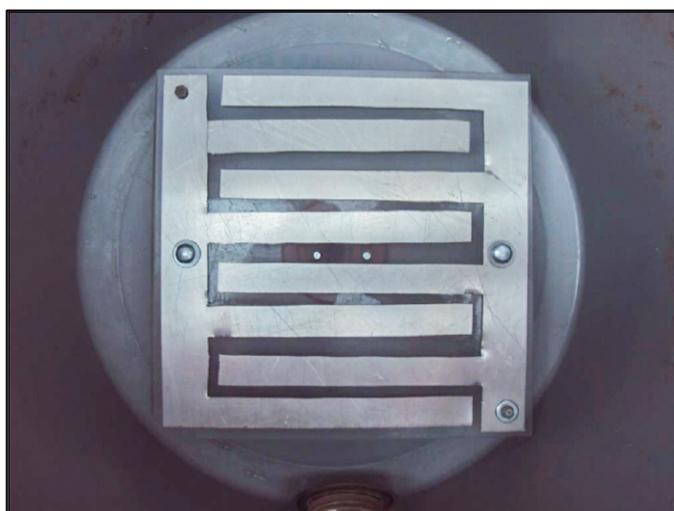


FIGURA 11 - ELETRODOS DE ALUMÍNIO FIXADOS NO FUNDO DA CUBA ELETROLÍTICA.
FONTE: Michelin (2013).

Segundo descrito por Michelin (2013), os eletrodos são conectados a uma fonte modelo OS-5000, operando em uma corrente contínua podendo variar de 0 a 4 Amperes e uma faixa de tensão fixada a 32 Volts. A eletrólise promove a separação da biomassa em suspensão de forma física, pela geração de microbolhas, e por meio de reações químicas, pela formação de hidróxido de alumínio.

O volume é completado com água potável, captada do poço semi-artesiano do estabelecimento, sempre que os níveis da coluna de água estão baixos. No entanto, não foi realizado o controle relacionado à concentração de células, ou microalgas, no volume, o que prejudicou o estudo referente à curva de crescimento das microalgas para este cultivo (PEGORARO, 2014).

Uma análise morfológica realizada por Leal (2015) identificou uma contaminação nos fotobiorreatores por outras espécies de microalgas, sendo estabelecida uma nova cultura mista (FIGURA 12). À este novo consórcio, a autora Leal (2015) atribuiu também a denominação de Mescla Devon's (MD). Logo, a fim de diferenciar a cultura mista caracterizada por Ortiz Rico (2014) da que foi estudada por Leal (2015), à esta última, no decorrer deste trabalho, será atribuída a denominação de Mescla Devon's 2 (MD2).

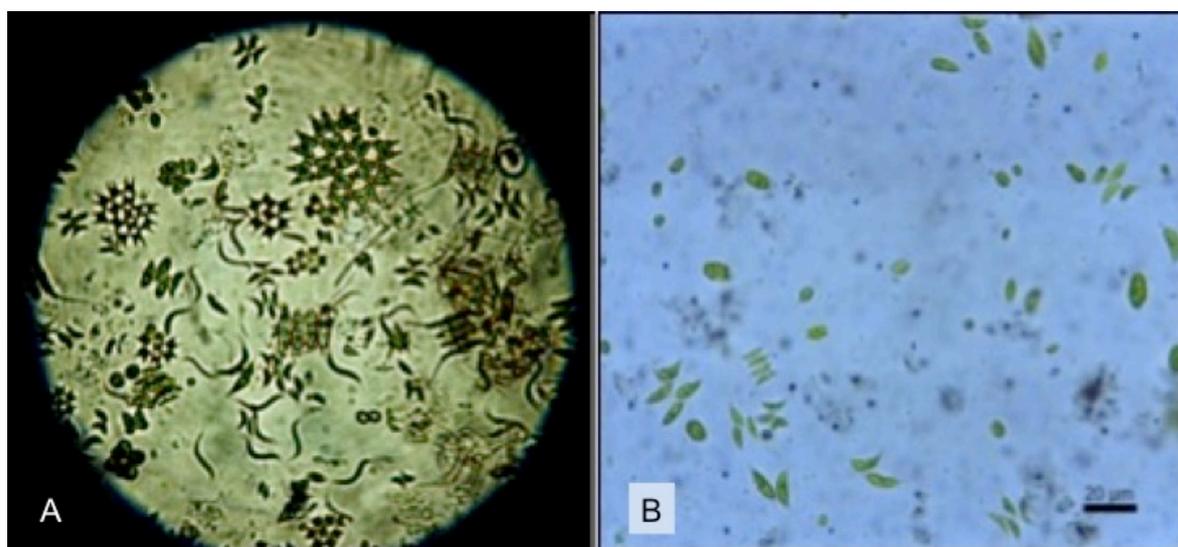


FIGURA 12 - MICROSCOPIA ÓPTICA DA MESCLA DEVON'S E MESCLA DEVON'S 2.
NOTA: (A) Mescla Devon's e (B) Mescla Devon's 2.
FONTE: Ortiz Rico (2014) e Leal (2015).

Segundo Leal (2015), esta contaminação com outras espécies de microalgas pode ser explicada devido ao fato que um dos fotobiorreatores instalados na churrascaria estava anteriormente funcionando com um cultivo de *Desmodesmos subspicatus* e o outro com um cultivo misto de microalgas, cujo inóculo correspondia a uma coleta do Passeio Público de Curitiba-PR (ORTIZ RICO, 2014). Como estes fotobiorreatores tem capacidade individual de 512 L, existe uma diferença em relação aos cultivos em escala laboratorial (bancada), uma vez que neste último caso, é possível manter um controle mais adequado de esterilidade dos frascos e meio de cultivo, garantindo uma inoculação mais adequada do ponto de vista de cultivos puros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a obtenção de ésteres etílicos a partir da biomassa de microalgas cultivadas em fotobiorreatores de placas planas que integram um sistema de tratamento biológico de emissões atmosféricas de uma churrascaria, com vistas à produção de biodiesel.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a colheita de biomassa de microalgas por eletroflotação e avaliar seu rendimento;
- Extrair e caracterizar os lipídeos da biomassa obtida;
- Promover a síntese de ésteres por transesterificação *in situ*;
- Avaliar o rendimento da produção de ésteres em relação à produção de biomassa;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos dos ésteres obtidos e estimar suas propriedades visando sua aplicação como biodiesel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICROALGAS E REAGENTES

Este trabalho foi desenvolvido utilizando como matéria-prima a biomassa da Mescla Devon's 2 (MD2), proveniente do sistema de tratamento biológico de emissões atmosféricas geradas pelas atividades de uma churrascaria, conforme já descrito no item 2.3. Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

4.2 OBTENÇÃO DA BIOMASSA

4.2.1 Condições de cultivo

Sob os cuidados da equipe do TECPAR, as microalgas foram inoculadas e cultivadas em fotobiorreatores de placas planas com 512 L de capacidade, contendo meio de cultivo Chu, sob condições naturais de luz e temperatura, sendo suplementado pelas emissões resultantes da queima do carvão vegetal na churrasqueira do estabelecimento (Devon's).

4.2.2 Colheita e secagem

A colheita da biomassa da MD2 foi realizada em 22 de maio de 2014. A biomassa formada foi separada do meio de cultivo por eletroflotação, seguida de sedimentação e secagem por liofilização (FIGURA 13). Foram realizadas 6 bateladas de 60 L, com recirculação do líquido clarificado para o fotobiorreator. O concentrado de microalgas foi acondicionado em galões de 5 L de polietileno de alta densidade (PEAD) para transporte até o Laboratório de Pesquisa Relacionada à Biomassa e Bioenergia (LAPREBB/UTFPR), Campus Ecoville, Curitiba-PR.

A biomassa foi eletroflotada, teve seu volume quantificado em provetas de 500 mL e armazenada em refrigerador (4 °C), sendo mantida em repouso por 24 h para sedimentação. O volume sedimentado foi determinado em provetas de 500 mL. Após, a biomassa foi congelada e desidratada por liofilização (Liotop, mod. L101), pesada em balança analítica (Eduotec®, mod. F2204C) e mantida em freezer.

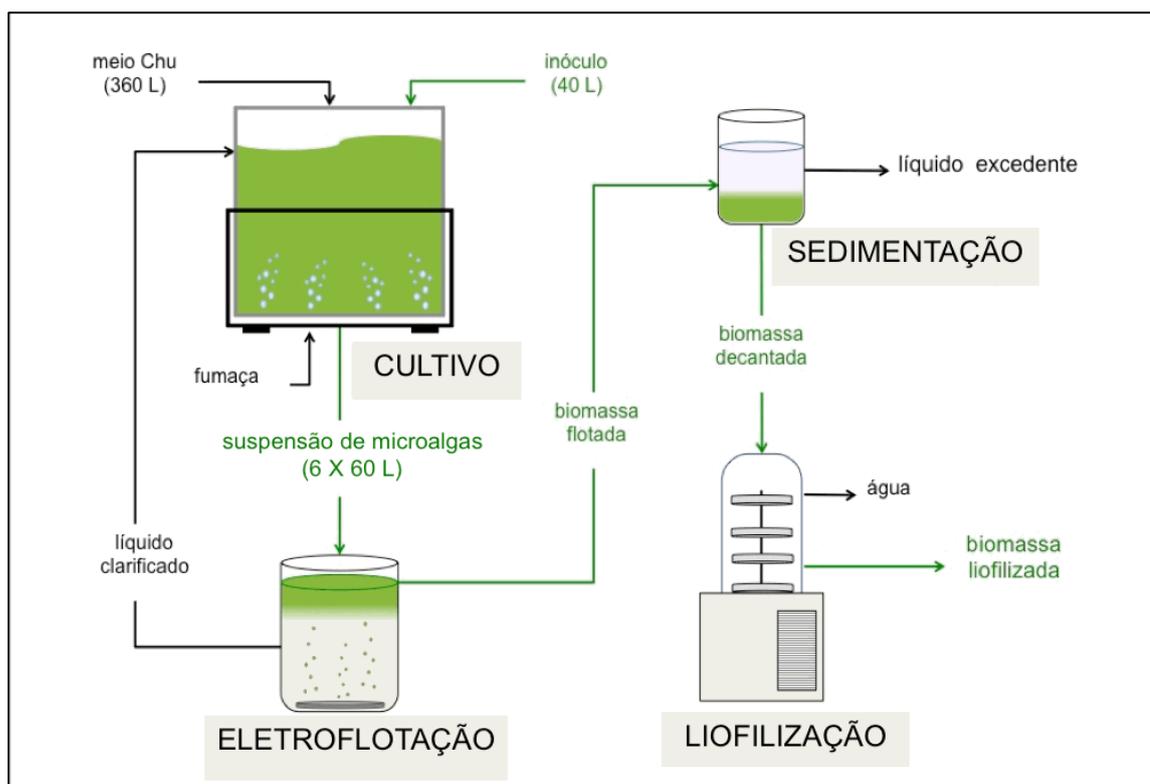


FIGURA 13 -ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS REALIZADAS PARA A OBTENÇÃO DA BIOMASSA LIOFILIZADA DA MD2.

4.2.3 Determinação de resíduos

A suspensão de microalgas presente no fotobiorreator foi caracterizada quanto ao teor de resíduos sólidos. Foram realizados ensaios para a determinação de resíduos totais (RT), resíduos não filtráveis (RNF) e resíduos filtráveis (RF) da suspensão de microalgas presente no fotobiorreator. Os ensaios foram conduzidos com base na metodologia descrita na NBR 10664 (ABNT, 1989).

4.2.3.1 Resíduos totais (RT)

A concentração de resíduo total (mg.L^{-1}) foi determinada pelo Método A - Resíduo total (sólidos totais) (ABNT, 1989).

Cápsulas de evaporação foram calibradas, sendo estas calcinadas em mufla a 550 °C por 1 h, esfriadas em dessecador, pesadas em balança analítica (Eduotec®; mod. F2204C) e mantidas em dessecador até o momento do uso.

Uma porção homogênea de amostra, com volume conhecido, foi medida com proveta, transferida para uma cápsula calibrada e evaporada em banho-maria termostaticado com tampa de bocas (CIENLAB®, mod. CE160) até a secura. Após, a cápsula com resíduo foi seca em estufa (Olidex cz, analógica) à temperatura entre 103 °C e 105 °C por 1 h, esfriada em dessecador e pesada em balança analítica. Os procedimentos de secagem em estufa, esfriamento e pesagem foram repetidos até que o conjunto (cápsula + resíduo) atingisse peso constante.

O resíduo total é dado pela Equação (1).

$$RT = \frac{(m_{C+R} - m_C) \times 1000}{V} \quad (1)$$

Sendo,

RT = resíduo total, em mg.L⁻¹;

m_C = massa da cápsula vazia, em mg;

m_{C+R} = massa da cápsula com resíduo total, em mg;

V = volume da amostra, em mL.

O procedimento foi realizado em triplicata e os valores obtidos correspondem à média dos pesos de resíduos totais.

4.2.3.2 Resíduos não filtráveis (RNF)

A quantificação da biomassa seca de microalgas por unidade de volume pode ser realizada a partir da filtração à vácuo da cultura microalgal em membrana

microporosa de fibra de vidro, na qual as microalgas (5-50 μm) ficam retidas (JENA, *et al.*, 2010; ORTIZ RICO, 2014).

A concentração de resíduos não filtráveis (mg.L^{-1}) foi dada pelo Método G - Resíduo não filtrável (sólidos suspensos) (ABNT, 1989),

Filtros de fibra de vidro de 47mm e com retenção de partículas até 0,5 μm (MN GF-2; Macherey-Nagel, Alemanha), foram colocados em cadinhos de *Gooch* conectados a um sistema de filtração com bomba de vácuo (Prismatec[®]; mod. 131) e lavados com três porções de 20 mL de água altamente deionizada. Em seguida, os cadinhos com os filtros foram calcinados em mufla a 550 °C por 1 h, resfriados em dessecador, pesados em balança analítica e mantidos no dessecador até o momento do uso. Uma porção homogênea das amostras, com volume conhecido, foi filtrada a vácuo até esgotar toda a água, sendo posteriormente lavada com três porções de 10 mL de água altamente deionizada. Após, o conjunto (cadinho + membrana + resíduo não filtrável) foi seco em estufa à temperatura entre 103 °C e 105 °C, esfriada em dessecador e pesada em balança analítica. O procedimento de secagem em estufa, esfriamento e pesagem foram repetidos até que o conjunto atingisse peso constante. O resíduo não filtrável é dado pela Equação (2):

$$RNF = \frac{[m_{C+F+R} - m_{C+F}] \times 1000}{V} \quad (2)$$

Sendo,

RNF = resíduo não filtrável, em mg.L^{-1} ;

m_{C+F} = massa do cadinho + filtro, em mg;

m_{C+F+R} = massa do cadinho com filtro e resíduo não filtrável, em mg;

V = volume da amostra, em mL.

O procedimento foi realizado em triplicata e os valores obtidos correspondem à média dos pesos de resíduos não filtráveis.

4.2.3.3 Resíduos filtráveis (RF)

A concentração de resíduos filtráveis (mg.L^{-1}) foi determinada pelo Método D - Resíduo filtrável (sólidos dissolvidos), calculado através da Equação 3, pela diferença entre os valores do resíduo total e do resíduo não filtrável.

$$RF = RT - RNF \quad (3)$$

Na qual,

RF = resíduo filtrável, em mg.L^{-1} .

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA

Para caracterizar a fração lipídica da MD2 foram definidos os seguintes parâmetros: lipídeos totais (LT) e índice de acidez (IA).

4.3.1 Determinação de lipídeos totais (LT)

O extrato lipídico da MD2 foi obtido em extrator Soxhlet (SOXHLET, 1879) (FIGURA 14) empregando os solventes metanol (99,5%; Cinética®), etanol (99,8%; Impex®) e n-hexano (PA; Isofar®, ref. 222), de acordo com a metodologia descrita por D'Oca *et al.* (2011), com adaptações.

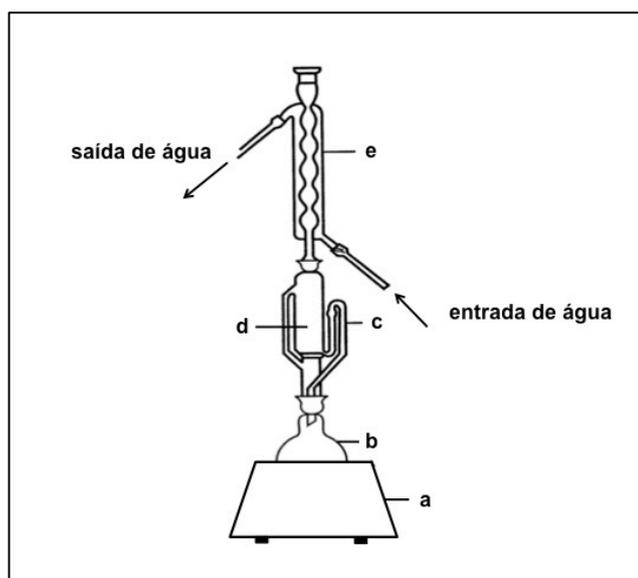


FIGURA 14 - ESQUEMA DE MONTAGEM DO APARATO PARA EXTRAÇÃO EM SOXHLET.
 NOTAS: (a) manta aquecedora, (b) balão de destilação, (c) sifão, (d) câmara de extração e (e) condensador de refluxo.
 FONTE: Adaptado de ANVISA (2010).

Em um cartucho de celulose, foram pesados 2 g de biomassa liofilizada, previamente secada em estufa (Nova Ética®; mod. 403-3D), a 60 °C por 1 h, e mantida em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Um balão de fundo chato de massa conhecida, contendo 200 mL do solvente em estudo, foi acoplado ao extrator e o cartucho com a matéria-prima foi introduzido na câmara de extração. O sistema foi aquecido em manta aquecedora (Fisatom®, mod.22) até a temperatura de ebulição do solvente (TABELA 8) por um período de 4 h.

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS DOS SOLVENTES EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA DA MD2.

Solvente	Fórmula química	Índice de polaridade	Temperatura de ebulição (°C)
Metanol	CH ₄ O	5,1	64,7
Etanol	C ₂ H ₆ O	5,2	78,0
n-Hexano	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	0,1	69,0
Água*	H ₂ O	10,2	100

FONTE: Adaptado de Ramluckam, Moodley e Bux (2014).
 NOTA: * Para comparação.

Decorrido o tempo de extração, o solvente foi removido em evaporador rotativo à vácuo (Fisatom[®], mod.550) e o material restante no balão foi seco em estufa (60 °C) até que o conjunto atingisse peso constante. O teor de lipídeos totais presentes na biomassa foi calculado empregando a Equação 4.

$$LT = \frac{P_2 - P_1}{m_b} \times 100 \quad (4)$$

Sendo,

LT = lipídeos totais (%);

P₁ = massa do balão vazio (g);

P₂ = massa do balão contendo o extrato lipídico (g);

m_b = massa de biomassa liofilizada (g).

4.3.2 Determinação do Índice de acidez (IA)

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. A decomposição dos glicerídios é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são frequentemente expressos em termos de índice de acidez, que é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessário para neutralizar um grama da amostra (IAL, 2008).

O índice de acidez dos lipídeos extraídos da MD2 foi determinado, em triplicata, por titulação com uma solução padrão alcalina, com base no método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz, o qual é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e gorduras animais (IAL, 2008). O procedimento foi adaptado para uma menor quantidade de amostra. Foram pesados 0,5 g do extrato hexânico em um erlenmeyer de 125 mL, seguido da adição de 15 mL da solução éter etílico: etanol (2:1) v/v (éter etílico 99,5%; Biotec[®] e etanol 99,8%; Impex[®]) e agitação até a completa dissolução da amostra. Com o auxílio de uma bureta de 25 mL e agitador

magnético (Edulab®), a amostra foi titulada lentamente (gota a gota) com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 99,0%; Impex®) 0,01 mol.L⁻¹, empregando fenolftaleína 1% como indicador, até o aparecimento de uma coloração rósea persistente por até 30 segundos. O índice de acidez é dado pela Equação 5, abaixo:

$$IA = \frac{V_{NaOH} \times f \times 0,561}{m_e} \quad (5)$$

Na qual,

IA = Índice de acidez (mg KOH.g⁻¹ de amostra);

V_{NaOH} = volume da solução de NaOH 0,01 mol.L⁻¹ gasto na titulação (mL);

m_e = massa do extrato lipídico (g);

f = fator de correção da solução de NaOH 0,01 mol.L⁻¹.

4.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÉSTERES

4.4.1 Reação de transesterificação *in situ*

A síntese de ésteres por transesterificação *in situ* (ou direta) foi realizada com base na metodologia descrita por Lewis, Nichols e McMeekin (2000), utilizando n-hexano como solvente. Devido ao alto índice de acidez dos lipídeos da MD2, foi estabelecida a transesterificação ácida (LEWIS; NICHOLS; McMEEKIN, 2000; CARVALHO JUNIOR, 2010; LEMÕES, 2011; SILVA-BAUMGÄRTNER, 2011; BRANCO, 2013). Etanol foi o álcool de escolha para esta etapa devido à sua menor toxicidade frente ao metanol.

Foi avaliada a produção de ésteres etílicos a partir da biomassa liofilizada do consórcio de microalgas (MD2), nas temperaturas de 45, 60 e 90 °C, em cinco tempos de reação: 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, de modo semelhante aos estudos realizados por Silva-Baumgärtner (2011) e Branco (2013) em biomassa liofilizada de microalgas.

Em tubos de ensaio de 15 mL foram pesados 20 mg de biomassa liofilizada. A este material, foram adicionados 3 mL da mistura etanol:HCl:n-hexano 10:1:1 (v/v/v) (HCl 37%; Impex[®] e n-hexano 95,0%; Panreac[®]). Em seguida, os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria com a temperatura e tempos de estudo ajustados. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram resfriados em água corrente até a temperatura ambiente. Foram adicionados 1 mL de água altamente deionizada, a fim de promover a separação de fases. Os ésteres foram extraídos por extração sucessiva, com 3 porções de 2 mL de n-hexano. Os sobrenadantes (fase orgânica) foram transferidos para tubos de ensaio de 7 mL e levados à estufa (35 °C) até a secura.

4.4.2 Análises cromatográficas

O perfil composicional em monoésteres foi realizado por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC). O cromatógrafo Shimadzu GC-2010 Plus com amostrador automático AOC-20i foi utilizado para esta determinação. Foram adicionados 0,6 mL de n-heptano (99,0%; Sigma-Aldrich) às amostras ($\pm 1,7$ mg) e um volume de injeção de 1 μ L destas foi injetado em modo de divisão de amostra de 1:50. A eluição utilizou hélio como gás de arraste a 230 kPa. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente. A programação de temperatura do forno e da coluna foi matricial, iniciando-se em 50 °C permanecendo por 1 min, aquecimento a 25 °C min^{-1} até 175 °C, depois a 4 °C min^{-1} até 230 °C finalizando com um estágio isotérmico nesta temperatura por 5 min, totalizando 25 min de corrida cromatográfica. A análise foi realizada em uma coluna Agilent DB-23 (60 m x 0,25 mm; 0,15 μ m). As curvas de calibração e os fatores de resposta do detector de ionização de chama foram determinados a partir de padrões cromatográficos dos ésteres e a quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando nonadecanoato de metila como padrão interno (faixa de concentração de 2,04 a 0,127 mg mL^{-1}), de acordo com o método EN 14103:2011.

4.4.3 Quantificação dos ésteres etílicos

A quantificação dos ésteres etílicos produzidos na transesterificação *in situ* da biomassa liofilizada da MD2 foi realizada utilizando fatores de correção teóricos para os ésteres com relação ao padrão interno empregado, conforme descrito por Visentainer (2012).

O fator de correção teórico é determinado, a partir da porcentagem mássica dos carbonos ativos (C*) presentes nas moléculas, ou seja, carbonos ligados a átomos de hidrogênio (C-H). Por exemplo, para calcular a porcentagem de carbonos ativos no estereato de etila (C18:0 etil éster) tem-se que a massa molar do estereato de etila é igual a 312,50 g.gmol⁻¹, sendo que a massa de carbonos ativos (massa de C*) é igual a 228,20 g.gmol⁻¹. Assim, para a massa molar de 312,50 g.gmol⁻¹ do composto de referência (100%), a porcentagem de carbonos ativos (228,20 g.gmol⁻¹) neste composto corresponderá a 73,03% (SILVA-BAUMGÄRTNER, 2011). Assim, o cálculo do fator de correção teórico foi realizado pela Equação 6.

$$F_{CT} = \frac{P_{PI}}{P_X} \quad (6)$$

Na qual,

F_{CT} = fator de correção teórico;

P_{PI} = porcentagem de carbonos ativos do padrão interno;

P_X = porcentagem de carbonos ativos do éster analisado.

Em seguida, com os fatores de correção determinados, a quantidade de ésteres etílicos produzidos foi calculada pela Equação 7.

$$M_X = \frac{M_{PI} \times A_X \times F_{CT}}{A_{PI} \times m_b} \quad (7)$$

Sendo que,

M_X = massa do éster etílico na amostra (mg.g^{-1});

M_{PI} = massa do padrão interno (mg);

m_b = massa da biomassa liofilizada (g);

A_X = área no cromatograma referente ao éster etílico;

A_{PI} = área no cromatograma referente ao padrão interno.

Obteve-se, assim, a quantidade de éster produzido por grama de biomassa liofilizada ($\text{mg de éster.g}^{-1}$ de biomassa liofilizada). Visando à discussão dos resultados, a quantidade de ésteres produzidos (mg) por massa de biomassa liofilizada (g) foi denominado de rendimento em ésteres (BRANCO, 2013).

Os dados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, empregando o *software* StatPlus[®]:mac LE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLHEITA

A suspensão de microalgas presente nos fotobiorreatores apresentou uma coloração verde-brilhante, acusando a presença de elementos fotossintetizantes.

Durante a eletroflotação, foi possível observar o escape das microbolhas geradas na eletrólise. O equipamento possui uma tubulação transparente conectada lateralmente, de onde foi possível acompanhar o acúmulo da biomassa microalgal na superfície (FIGURA 15).

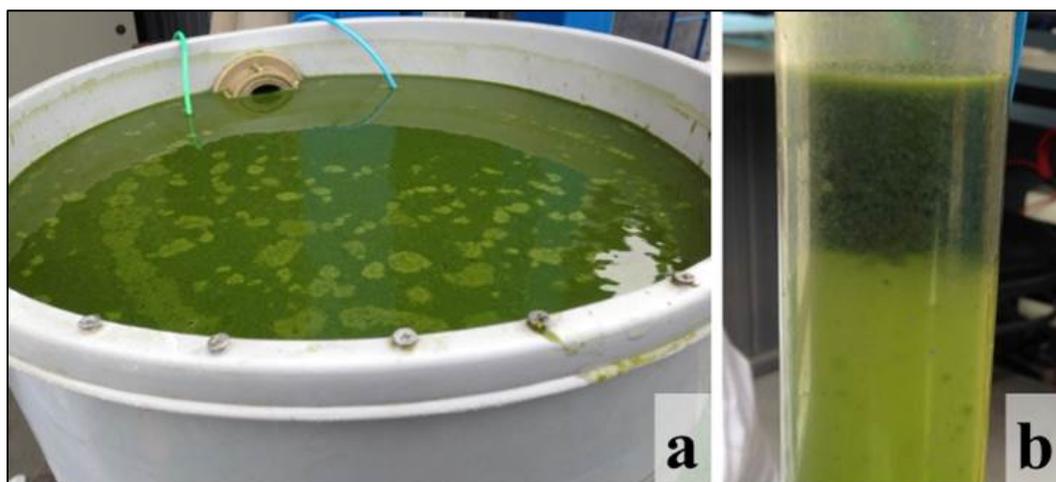


FIGURA 15 - ELETROFLOTADOR EM FUNCIONAMENTO.

NOTAS: (a) escape de microbolhas; (b) visualização do acúmulo da biomassa de microalgas na superfície do equipamento.

Dos 360 L de suspensão de microalgas do fotobiorreator submetidos à eletroflotação, foram coletados 12,384 L de concentrado de microalgas, ou seja, 3,44% do volume processado. A eletroflotação demonstrou ser um método prático e eficiente para a concentração de biomassa microalgal. Porém, após o acondicionamento do concentrado nos galões, foi observado que a biomassa acumulava-se no fundo após alguns minutos em repouso, revelando uma grande quantidade de água. Houve uma preocupação em retirar a máxima quantidade de água possível, a fim de agilizar o processo de liofilização. Este material foi deixado em repouso para sedimentar sob refrigeração por 24 h. Após este tempo, foi possível recuperar 5,754 L de material sedimentado, ou seja, 46,46% em volume referente ao total concentrado na eletroflotação. Após a liofilização deste volume, foram obtidos 122,29 g de biomassa liofilizada (FIGURA 16), um rendimento de **0,3397 g.L⁻¹** de biomassa seca com relação à suspensão de microalgas submetida à eletroflotação. Comparando com a literatura, Vieira (2011) obteve um rendimento de 0,4307 g.L⁻¹ de *Chlorella sp.* cultivada em fotobiorreator de bancada, em meio Watanabe e suplementado com gás de um incinerador de produtos sólidos tóxicos. Pereira (2013) conseguiu valores de 0,451 g.L⁻¹ de biomassa a partir de uma mistura de espécie de microalgas com predominância do gênero *Scenedesmus sp.* em meio Chu suplementado com CO₂.

Apesar do total de biomassa liofilizada obtida neste processo encontrar-se abaixo dos valores relatados na literatura, deve-se considerar a presença de

biomassa no líquido clarificado. Conforme adotado por Michelin (2014), o processo de eletroflotação opera durante 10 (dez) minutos, visto que não há interesse em uma separação total das microalgas em suspensão. Neste caso, o líquido clarificado é reintroduzido no fotobiorreator, sendo a biomassa residual utilizada como novo inóculo. De fato, a concentração de células (RNF; ítem 5.1) presentes no fotobiorreator é bem superior à concentração do material liofilizado, que correspondeu a 48,72 % da quantidade em peso seco presente no fotobiorreator e que foi submetido ao processo de eletroflotação.

O estudo relacionado à curva de crescimento da microalga nos fotobiorreatores para este sistema de cultivo não foi realizado devido à falta de controle da concentração de células no momento da inoculação. Através deste estudo é possível determinar as fases de crescimento da microalga e identificar fatores que possam interferir na produção de biomassa nos fotobiorreatores. O conhecimento da fase de crescimento exponencial ajuda a determinar o período em que o sistema apresenta maior densidade de células antes de atingir a fase estacionária, podendo ser realizado um planejamento para definir os dias de colheita, o que poderia gerar maior rendimento em biomassa.

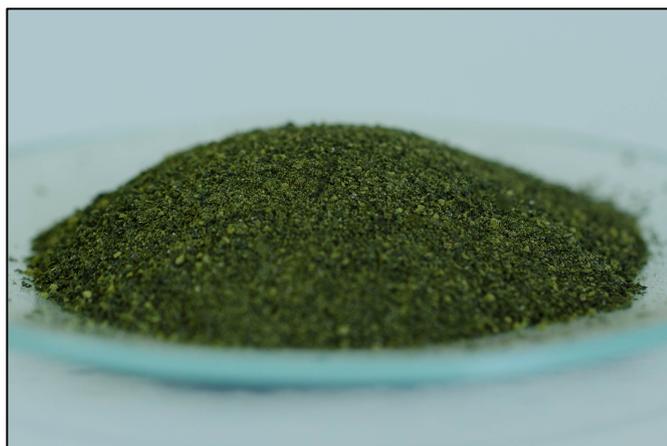


FIGURA 16 - BIOMASSA LIOFILIZADA DA MD2.

5.2 RESÍDUOS

A suspensão de microalgas presente no fotobiorreator foi caracterizada quanto ao teor de resíduos (sólidos). Os resíduos totais (RT) constituem o material

remanescente na cápsula após a evaporação parcial da amostra e posterior secagem em estufa até massa constante (ABNT, 1989). Estes, por sua vez, são constituídos por resíduos filtráveis (RF) e resíduos não filtráveis (RNF). Este último parâmetro pode ser usado para estimar a concentração, em peso seco, de biomassa de microalgas (JENA, *et al.*, 2010; BJERK, 2012; ORTIZ RICO, 2014).

Os resultados de resíduos totais (RT), filtráveis (RF) e não filtráveis (RNF), apresentaram valores de **(776,47 ± 10,38) mg.L⁻¹**; **(697,33 ± 30,46) mg.L⁻¹** e **(79,14 ± 10,04) mg.L⁻¹**; respectivamente (FIGURA 17). A concentração de RNF, ou sólidos suspensos, correspondeu a 89,80 % dos RT presentes na suspensão de microalgas do fotobiorreator. A concentração de RF, ou sólidos dissolvidos, foi o equivalente à 10,2%, correspondendo aos sais constituintes do meio Chu, solúveis em água.

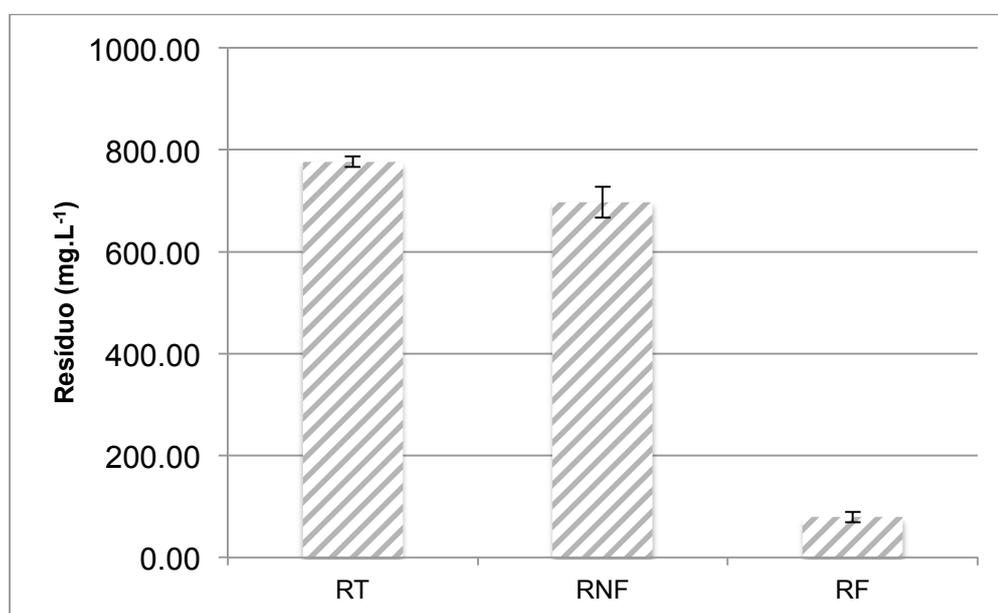


FIGURA 17 - TEOR DE RESÍDUOS PRESENTES NA SUSPENSÃO DE MICROALGAS DO FOTOBIORREATOR.

Em estudo anterior, Ortiz Rico (2014) utilizou o método de filtração por membrana de fibra de vidro para determinar a concentração em peso seco das biomassas de Mescla Devon's e de uma linhagem de *Desmodesmus subspicatus*, cultivados em meio Chu e submetidas à injeção de fumaça deste sistema. A máxima concentração obtida pela Mescla Devon's foi de 0,473 g.L⁻¹, alcançada aos 20 dias de cultivo. A *D. subspicatus*, por sua vez, mostrou uma concentração 0,283 g.L⁻¹ em

peso seco aos 23 dias de cultivo. Quantitativamente, a concentração em peso seco da MD2 foi 1,5 vezes superior ao melhor resultado apresentado para a Mescla Devon's e 2,5 vezes superior ao melhor resultado apresentado para *D. subspicatus*.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS

5.3.1 Lipídeos totais

Foi avaliada a extração da fração lipídica presente na biomassa de MD2, em extrator Soxhlet, empregando os solventes metanol, etanol e n-hexano. Os valores encontrados para lipídeos totais encontram-se dispostos na Tabela 9 e uma representação gráfica encontra-se na Figura 18.

TABELA 9 - LIPÍDEOS TOTAIS DA BIOMASSA DA MD2.

Solvente	Lipídeos % (m/m)*	desvio padrão (s)
metanol	18,18	1,15
etanol	18,72	1,21
n-hexano	11,44	1,62

NOTA: * Média das triplicatas das porcentagens mássicas dos extratos brutos obtidos por Soxhlet com relação à biomassa liofilizada.

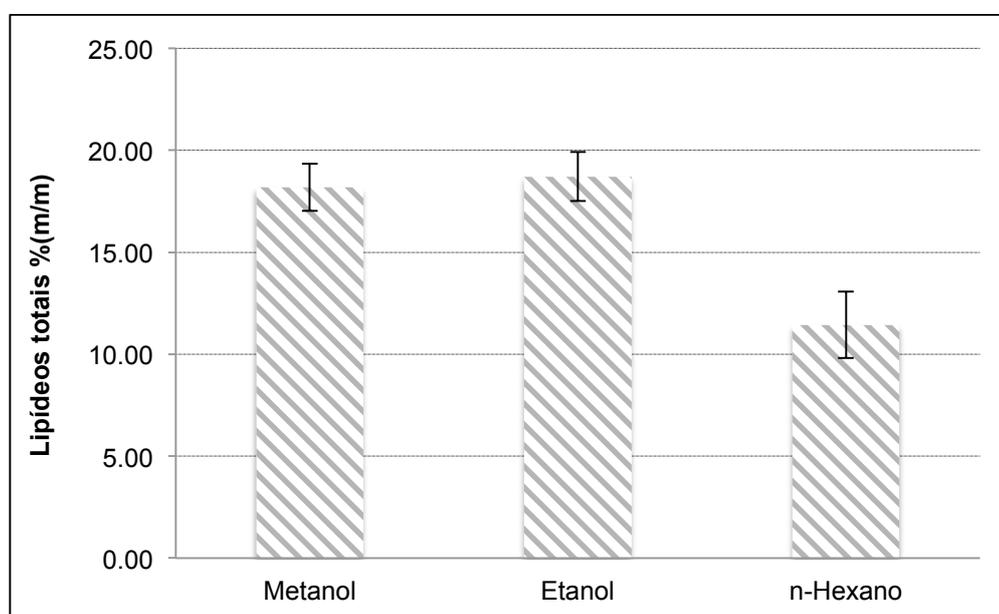


FIGURA 18 - LIPÍDEOS TOTAIS DA MD2 OBTIDOS POR SOXHLET.

Os lipídeos são produzidos a partir de grupos diversificados de substâncias biológicas, onde alguns são polares e outros apolares (NELSON; COX, 2011; RAMLUCKAM; MOODLEY; BUX, 2014). Os lipídeos das microalgas estão classificados em apolares, como os triacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa, e lipídeos mais polares, como o fosfolipídeos e glicolipídeos, além dos ácidos graxos de cadeias curtas (ORTIZ RICO, 2014). Os lipídeos de armazenamento (gorduras e óleos), utilizados como formas de armazenamento de energia nos organismos vivos, são derivados de ácidos graxos e podem ser melhor extraídos por solventes orgânicos apolares (NELSON; COX, 2011). Os lipídeos de membrana são moléculas anfipáticas (possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica). Os tipos de lipídeos de membrana são os glicerofosfolipídeos, galactolipídeos, sulfolipídeos, esfingolipídeos e esteróis e são melhor extraídos por solventes orgânicos polares, como o etanol e o metanol (NELSON; COX, 2011). Além dos lipídeos de membrana, os solventes etanol e metanol podem extrair outros componentes celulares polares como aminoácidos e fenóis (CASTRO; GUTIERREZ, 1979; SPAGOLLA *et al.*, 2009), além de pigmentos como clorofilídeo e feoforbídeo (NELSON; COX, 2011). Ramluckan, Moodley e Bux (2014), investigaram a aplicação de 13 solventes com diferentes polaridades para avaliar a extração de lipídeos em biomassa mista de microalgas com predominância de indivíduos do gênero *Chlorella sp.* Os pesquisadores obtiveram os melhores resultados em lipídeos com o solvente clorofórmio, seguido de etanol e n-hexano, com rendimentos entre 10% e 10,78%. Quando usaram metanol, não conseguiram um rendimento maior do que 7%. D'Oca *et al.* (2011) estudaram a extração de lipídeos da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa* empregando diferentes técnicas e solventes com diferentes polaridades (mistura clorofórmio:metanol, metanol, clorofórmio, etanol e n-hexano). Foi observado que houve um aumento na quantidade de lipídeos extraídos conforme a polaridade do solvente aumentou. O melhor resultado relatado pelos autores em Soxhlet foi obtido com etanol (19,01%), muito próximo ao valor obtido pela MD2 com este mesmo solvente, seguido de clorofórmio (16,20%). O valor mais baixo foi obtido com n-hexano em todos os tratamentos estudados e, mesmo com o aumento do tempo de extração, o valor obtido não foi maior do que 3%. Segundo os autores, este fato é um indicativo de uma menor quantidade de lipídeos apolares na amostra, tais como os triacilgliceróis, demonstrando que a grande maioria dos lipídeos da biomassa dessa microalga são de natureza polar. Logo, o fato de maiores valores de

teor lipídico da MD2 terem sido obtidos com etanol e metanol pode ser um indicativo da maior presença de lipídeos polares na biomassa. Além disso, o uso destes solventes pode ter ocasionado o arraste de outras substâncias polares como pigmentos, aminoácidos e fenóis. Porém, a presença destes componentes na biomassa da MD2 deve ser melhor investigada.

Os valores para lipídeos totais da MD2 são condizentes com os da literatura. Em estudo anterior, Leal (2015), atingiu 17% de lipídeos totais para MD2 utilizando o método de Bligh e Dyer, um método de extração à frio que emprega clorofórmio, metanol e água. Este valor está muito próximo ao obtido neste trabalho em Soxhlet com metanol (64 °C; 4 h) e etanol (78 °C; 4 h). No entanto, tendo em vista a proximidade destes valores, o uso do Soxhlet para a extração dos lipídeos totais desta biomassa foi menos vantajoso quando comparado ao método à frio devido ao gasto energético com a manta aquecedora e o gasto de água empregada no arrefecimento do condensador. Com relação ao n-hexano, é possível encontrar na literatura vários estudos em que este solvente foi usado como extrator de lipídeos de microalgas. Silva-Baumgärtner (2011) obteve 5,96% de lipídeos em *Scenedesmus sp.*; Wu *et al.* (2012a) obtiveram 5,38% em *Nannochloropsis oculata*; Matos *et al.* (2015) relataram 11,46% de lipídeos totais em biomassa de *Chlorella sp.*; Araya *et al.* (2014) alcançaram 9,79% para a biomassa de *Chlorella protothecoides* e 8,47% para *Chlorella vulgaris*. Apesar do rendimento na extração de lipídeos da MD2 por n-hexano estar dentro dos valores relatados na literatura, ainda foi muito inferior ao relatado por Kanda *et al.* (2015), que chegaram a um teor lipídico de 31,8% com a microalga *Euglena gracilis*. Quanto ao uso do etanol como solvente extrator, os resultados estão dentro dos mencionados na literatura, com 8,11% e 32,89% de rendimento em *Nannochloropsis oculata* (CARVALHO JUNIOR, 2010) e 11% em biomassa de *Chlorella sp.* (ALVES SOBRINHO, 2012).

O conteúdo lipídico das microalgas varia consideravelmente entre diferentes espécies. A composição e as características dos lipídeos extraídos de uma espécie em particular é afetada pelas condições de cultivo, como composição do meio, temperatura, intensidade de iluminação, fotoperíodo e aeração (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015), além da diferença nos métodos de extração e nas características do solvente (BRANCO, 2013). Zhu *et al.* (2013) mostraram que o teor de lipídeos produzidos por uma cultura de *Chlorella zofingiensis* diminuiu na medida em que a concentração de nutrientes aumentou. De acordo com os autores,

as microalgas cultivadas em meio contendo menores concentrações de nutrientes apresentaram menor crescimento de biomassa. Conseqüentemente, essas microalgas receberam uma maior intensidade de luz, o que promoveu a produção e o armazenamento de lipídeos em suas células.

5.3.2 Características dos extratos obtidos com diferentes solventes

Foi observado que todos os extratos apresentaram aspecto viscoso, semelhante à graxa. Com relação à pigmentação, o extrato obtido com metanol apresentou cor verde-brilhante, enquanto o obtido com etanol tornou-se marrom-oliva. No entanto, o extrato hexânico apresentou cor amarela (FIGURA 19).

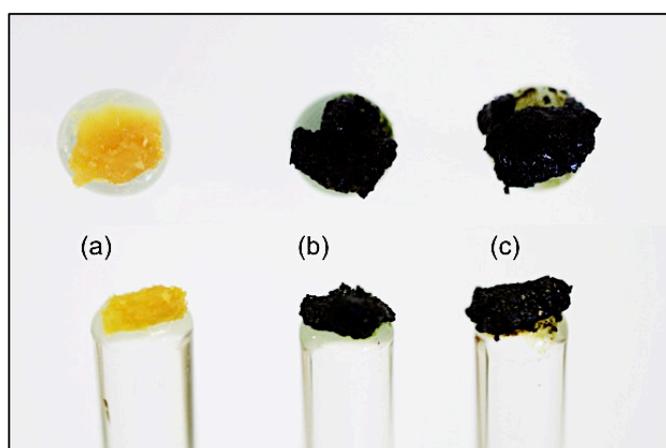


FIGURA 19 - EXTRATOS LIPÍDICOS DA MD2 OBTIDOS POR SOXHLET.
NOTA: Extratos (a) hexânico, (b) etanólico e (c) metanólico.

Esta diferença na aparência dos extratos pode estar relacionada à polaridade dos solventes usados na extração dos lipídeos e sua ação frente aos pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e carotenóides) presentes nos cloroplastos das microalgas. Embora as moléculas de clorofila sejam apolares, são quimicamente instáveis e relativamente sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e à degradação química, podendo sofrer alterações facilmente (STREIT *et al.*, 2005). De acordo com a explicação de Lanfer-Marquez (2003) e Cavalcanti *et al.* (2013), com a remoção do átomo de magnésio presente na molécula de clorofila, ocorre a formação da

feofitina. Tanto a clorofila quanto a feofitina são moléculas apolares devido à presença de uma cauda hidrocarbônica (grupo fitol). Quando a clorofila (FIGURA 20) e a feofitina perdem o grupo fitol, formam-se substâncias polares denominadas clorofilídeo e feoforbídeo, respectivamente. Uma das características da feofitina e do feoforbídeo é sua cor marrom-oliva, ocasionada pela ausência do átomo de magnésio. O clorofilídeo, no entanto mantém a cor verde e possui quase a mesma absorvância da clorofila. Além das clorofilas, as membranas tilacóides dos cloroplastos contêm pigmentos secundários de absorção de luz, ou pigmentos acessórios, chamados de carotenóides. Podem ser de cor amarela, vermelha ou púrpura. Os mais importantes são o β -caroteno, que é um isoprenóide laranja-avermelhado, e o carotenóide amarelo luteína (NELSON; COX, 2011). Os carotenóides são moléculas lipofílicas, sendo necessário o uso de um solvente apolar para sua extração (GARCIA-PLAZAOLA *et al.*, 2012).

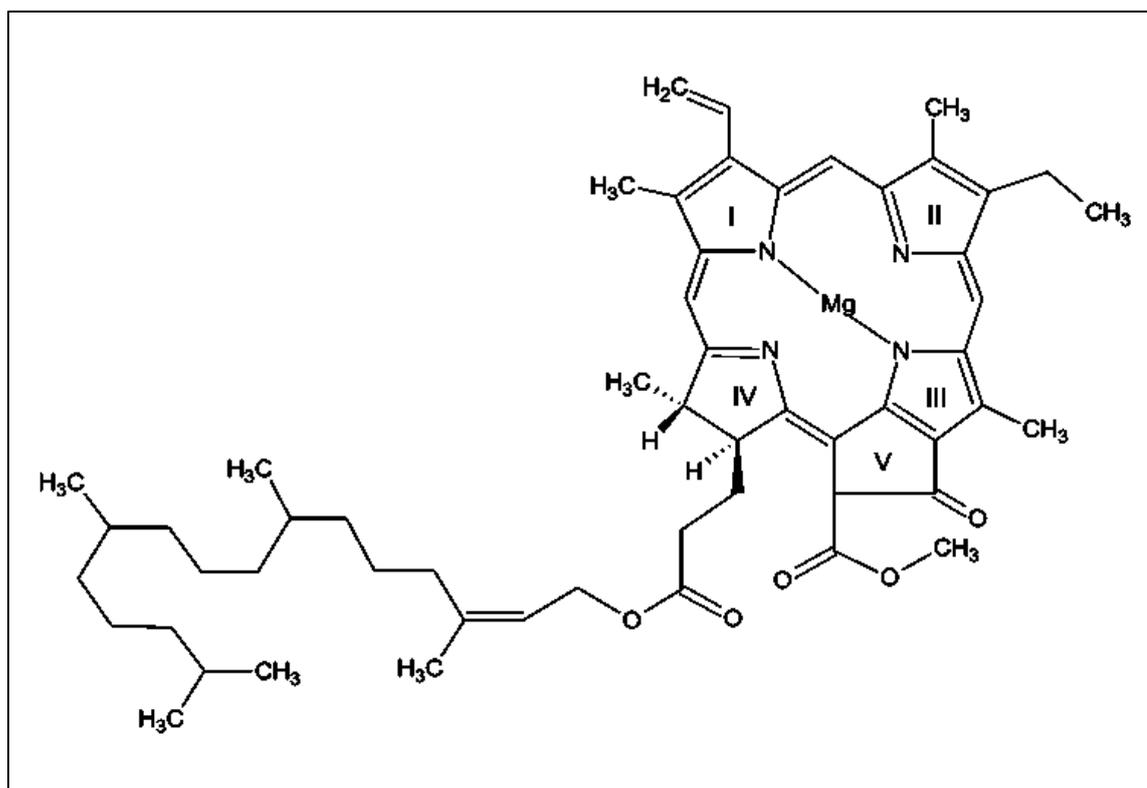


FIGURA 20 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DE CLOROFILA.
FONTE: Lanfer-Marquez (2003).

5.3.3 Índice de acidez

O índice de acidez do extrato lipídico foi determinado para definir a rota catalítica adequada para a reação de transesterificação *in situ*. De acordo com Sharma *et al.* (2008), para amostras que apresentam índice de acidez superior a 2,0 mg KOH.g⁻¹ recomenda-se a catálise ácida para a reação de transesterificação, apesar de alguns autores recomendarem o uso de catalisadores básicos para amostras com índice de acidez de até 4,0 mg KOH.g⁻¹.

O índice de acidez do extrato hexânico foi determinado por titulação com NaOH (0,01 mol.L⁻¹), empregando fenolftaleína como indicador. Para os extratos alcoólicos este procedimento não foi realizado devido à cor escura destes, que não possibilitou a visualização do ponto de neutralização dos ácidos graxos, determinada pelo aparecimento da coloração rósea clara, característico do indicador fenolftaleína.

Os resultados revelaram que o extrato hexânico da MD2 possui um elevado índice de acidez, correspondente à **29,54 ± 2,76 mg KOH.g⁻¹**. Isto justificou o uso de um catalisador ácido para uso na reação de transesterificação *in situ*, uma vez que um catalisador alcalino poderia interferir negativamente na produção de ésteres. No meio ácido, o catalisador alcalino é neutralizado e perde sua eficiência, promovendo reações indesejáveis, como a saponificação dos triacilgliceróis e/ou dos ésteres monoalquílicos formados, além de dificultarem a separação dos ésteres dos coprodutos formados na reação (glicerol, sabão e etc.) (EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010; GA *et al.*, 2014; FERREIRA; SILVA; ARROYO, 2014).

A diferença entre os índices de acidez dos lipídeos de microalgas relatados na literatura é grande. Apesar do índice de acidez dos lipídeos da MD2 ser considerado elevado para ser transesterificado por via alcalina, ainda é muito inferior ao relatado por Farias *et al.* (2011) para *Chlorella sp.*, com 112,76 mg KOH.g⁻¹; Chinnasamy *et al.* (2010) para um consórcio de microalgas, cultivadas em uma mistura de efluente industrial e doméstico, com 99,0 mg KOH.g⁻¹ e Alves Sobrinho (2012) para *Chlorella sp.*, com 45,2 mg KOH.g⁻¹. Outros valores para índice de acidez de lipídeos de microalgas são relatados, dentre os quais: 10,21 mg KOH.g⁻¹ em *Chlorella sp.* (EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010); 4,9 e 14,3 mg KOH.g⁻¹ em *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.*, respectivamente (SILVA-BAUMGÄRTNER, 2011) e 6,89 mg KOH.g⁻¹ em *Scenedesmus sp.* (BRANCO, 2013).

5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES

Neste estudo foi avaliada a obtenção de ésteres etílicos pela transesterificação *in situ* da biomassa liofilizada da MD2, visando à produção de biodiesel. Devido ao alto índice de acidez do conteúdo lipídico presente na biomassa (item 5.3.3), foi definida a catálise ácida como rota adequada para a reação, sendo usado HCl como catalisador (LEWIS; NICHOLS; McMEEKIN, 2000; EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010; ALVES, 2012). Os parâmetros estudados foram temperatura (45, 60 e 90 °C) e tempo de reação (30, 60, 90, 120 e 180 min.), totalizando 15 tratamentos.

5.4.1 Rendimento dos ésteres etílicos produzidos

A formação de ésteres etílicos de ácidos graxos foi confirmada por cromatografia gasosa (CG) e quantificada por padronização interna. Devido a problemas com a amostra referente ao tratamento mais brando (45 °C; 30 min), não foi possível determinar esse dado. A Tabela 10 apresenta a quantidade de ésteres etílicos produzidos em todos os tratamentos, exceto no mais brando.

TABELA 10 - QUANTIDADE DE ÉSTERES PRODUZIDOS POR TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* DA BIOMASSA DA MD2.

Tempo (min.)	Rendimento em ésteres (mg de ésteres.g ⁻¹ de biomassa liofilizada)		
	45 °C	60 °C	90 °C
30	nd	29,38 ^a	36,61 ^a
60	20,59 ^a	16,03 ^b	30,35 ^b
90	20,15 ^a	16,37 ^b	26,55 ^c
120	26,97 ^b	30,79 ^c	35,91 ^a
180	37,81 ^c	40,15 ^d	43,03 ^d

NOTA: nd = não determinado; valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade.

Os maiores rendimentos em ésteres corresponderam a: 3,78%, 4,01% e 4,30% de biomassa seca, nas temperaturas de 45, 60 e 90 °C, respectivamente. Marques (2013) conduziu experimentações de transesterificação *in situ* a partir das

biomassas de *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis sp.*, empregando metanol e ácido sulfúrico a 55 °C. O autor obteve 19,9% e 17,8% de ésteres metílicos, respectivamente, após 6 horas de reação. Quando aumentou o tempo de reação para 24 horas, obteve 42,0% de ésteres metílicos em peso seco da microalga *Nannochloropsis sp.*, não observando aumento significativo para a biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus*. Branco (2013) obteve 8,48% e 7,52% em ésteres etílicos em *Scenedesmus sp.*, utilizando os solventes n-hexano e clorofórmio, após 90 e 150 minutos de reação, respectivamente, ambos na temperatura de 60 °C. Silva-Baumgärtner chegou aos 6,70% em ésteres etílicos a 60 °C a partir da biomassa de *Scenedesmus sp.* e Komolafe *et al.* (2014) chegaram a 25,7% de ésteres metílicos a partir de um consórcio de microalgas cultivadas em efluentes de uma planta de tratamento de águas residuais. Os autores Im, Kim e Lee (2015) chegaram a um rendimento máximo de ésteres etílicos de 12,05% com relação à biomassa seca de *N. gatinana*.

Os rendimentos em ésteres obtidos neste estudo estão muito abaixo dos relatados na literatura. Este fato está possivelmente relacionado à perdas nos rendimentos em ésteres ao decorrer da reação. A Figura 21 ilustra o comportamento das reações ao longo do tempo.

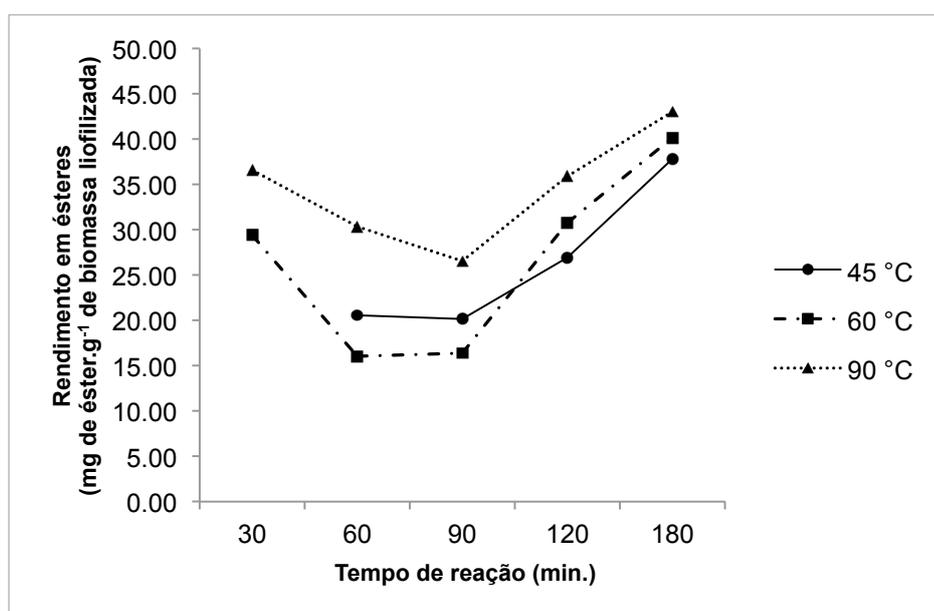


FIGURA 21 - QUANTIDADE DE ÉSTERES ETÍlicos PRODUZIDOS NA TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.

Ao comparar o comportamento das reações a 60 e 90 °C, nota-se que os rendimentos em ésteres caem bruscamente após os 30 minutos e somente voltam a crescer após os 90 minutos. A maior variação foi observada para o tratamento a 90 °C, com uma perda de produto chegando aos 72,5%, e para os realizados a 60 °C esta variação chegou aos 54,6%. A partir dos 90 minutos a reação ocorreu mais rapidamente a 60 °C em comparação às demais temperaturas, apresentando ainda uma tendência de aumento.

Com relação à quedas bruscas nos rendimentos em ésteres, comportamentos semelhantes foram relatados por outros autores em reações de transesterificação *in situ* empregando a mesma metodologia usada neste estudo. Silva-Baumgärtner (2011) relatou comportamentos deste tipo (FIGURA 22) quando conduziu experimentos de transesterificação *in situ* em biomassa de *Spirulina sp.* e *Scenedesmus sp.* submetidos a tratamentos variando o tipo de álcool (metanol ou etanol) e o solvente empregado (hexano ou clorofórmio). Em seu estudo, a autora observou que, nas reações conduzidas em temperaturas mais elevadas, ocasionalmente ocorriam vazamentos nos tubos de ensaio devidos à volatilidade dos reagentes, sendo necessário o descarte do conteúdo. Outra razão possível apontada pela autora é o fato de que, a estas temperaturas, uma parte significativa dos reagentes se encontra na fase vapor. Como a reação ocorre pelo contato da biomassa (sólida) com o reagente (líquido), este menor contato entre as fases pode ter conduzido, conseqüentemente, a uma diminuição no rendimento em ésteres. Trevisan *et al.* (2013) relatou este comportamento na transesterificação *in situ* da biomassa de *Chlorella sp.* quando usou etanol e n-hexano a 75 °C. De modo semelhante, Branco (2013) observou este comportamento também em biomassa de *Scenedesmus sp.* Além dos problemas relacionados a micro vazamentos nos tubos de ensaio, interferindo no equilíbrio da reação, problemas relacionados à volatilidade dos solventes também foram considerados pela autora, podendo estar relacionados a uma perda de ésteres produzidos devida à emulsificação do meio pela maior presença de mono e diacilgliceróis resultantes de uma diminuição da velocidade de reação. Estes problemas de vazamentos também foram enfrentados neste estudo e quando isto acontecia o frasco era substituído e o experimento refeito. No entanto, vazamentos imperceptíveis podem ter ocorrido.

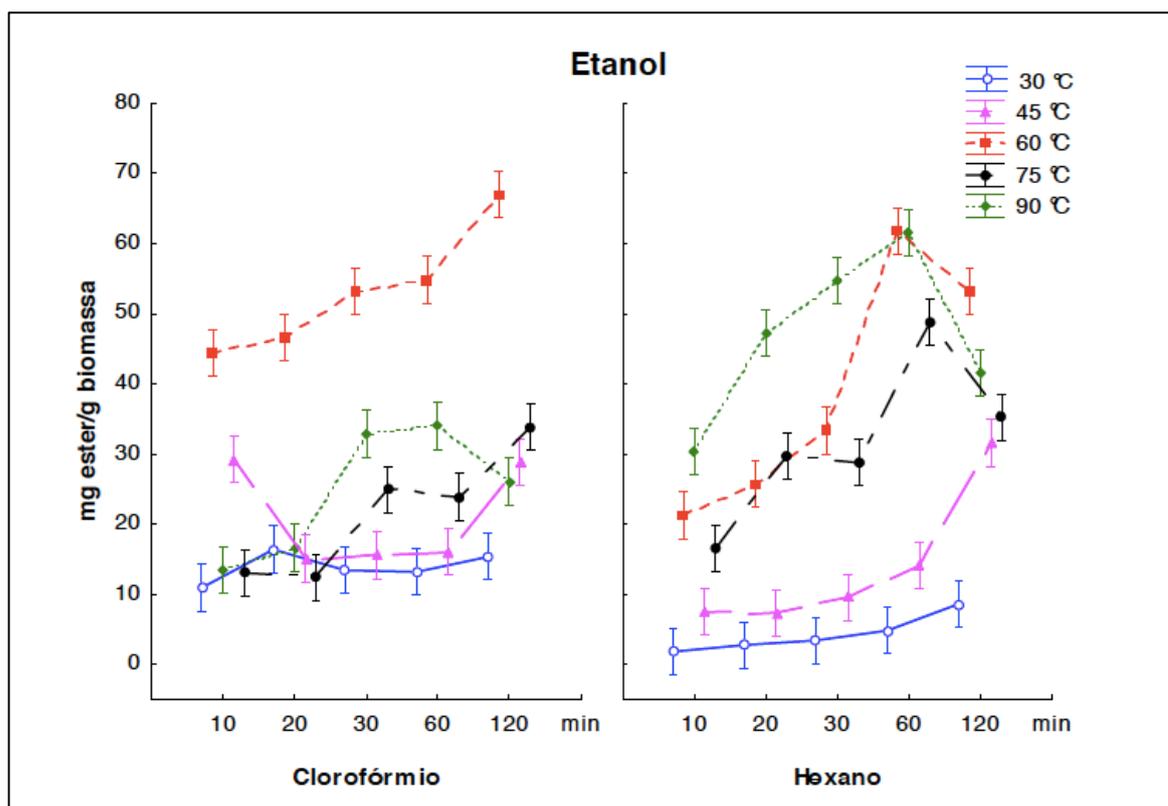


FIGURA 22 - QUANTIDADE DE ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A PARTIR DA BIOMASSA DE *Scenedesmus sp.*
 FONTE: SILVA-BAUMGÄRTNER (2011).

5.4.2 Perfil cromatográfico

As análises por CG confirmaram a presença de ésteres etílicos em todos os tratamentos empregados na transesterificação *in situ*. Os maiores rendimentos em ésteres foram obtidos após 180 min (APÊNDICES 1, 2 e 3). A amostra que recebeu o tratamento na temperatura de 60 °C apresentou maior variedade de ésteres etílicos, com maior concentração de insaturados e menor concentração de saturados. Nos tratamentos a 45 e 90 °C, o total de saturados, monoinsaturados e poliinsaturados foi semelhante. Em todos os tratamentos houve predominância de ésteres etílicos dos ácidos graxos palmitoléico e linoléico. A Tabela 11 mostra o perfil de ésteres etílicos de ácidos graxos obtidos na transesterificação *in situ* da biomassa de MD2.

TABELA 11 - PERFIL COMPOSICIONAL DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS NA TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* DA MD2.

Ésteres etílicos	Nomenclatura	Composição % (m/m)		
		45 °C	60 °C	90 °C
C10:0	Decanoato (cáprico)	3,36	1,37	2,30
C11:0	Undecanoato	3,86	1,19	3,41
C12:0	Dodecanoato (láurico)	2,37	0,95	1,96
C13:0	Tridecanoato	-	0,55	2,07
C14:0	Tetradecanoato (mirístico)	1,72	0,83	-
C14:1	Tetradecenoato	-	0,53	-
C15:0	Pentadecanoato	0,86	-	-
C15:1	Pentadecenoato	-	0,45	0,63
C16:0	Hexadecanoato (palmítico)	0,51	0,19	-
C16:1	Hexadecenoato (palmitoléico)	30,54	32,30	28,14
C17:0	Heptadecanoato	-	0,30	0,40
C17:1	Heptadecenoato	1,69	1,09	1,24
C18:0	Octadecanoato (esteárico)	2,04	1,91	2,46
C18:1	Octadecenoato (oléico)	-	-	-
C18:2*	Octadecadienoato (linoléico)	32,69	34,19	30,47
C18:3*	Octadecatrienoato	7,76	8,59	8,00
C20:0	Eicosanoato (araquídico)	8,45	7,62	9,39
C20:2	Eicosadienoato	-	0,76	1,06
C21:0	Eneicosadienoato	2,82	0,47	0,54
C22:1	Docosaneato (erúico)	1,34	1,69	3,74
C24:0	Tetracosanoato	-	2,72	2,20
C22:2	Docosadienóico	-	2,30	1,34
C24:1	Tetracosenoato	-	-	0,65
Total saturados		25,99	18,11	24,72
Total monoinsaturados		33,57	36,06	34,41
Total poliinsaturados		40,45	45,83	40,86

NOTAS: *Todas as configurações.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 11, o perfil dos ésteres etílicos obtidos mostrou variação entre os tratamentos em 45 e 90 °C. Porém, apesar do maior número de componentes nos ésteres obtidos a 90 °C, ambos apresentam proporções muito próximas no total de ésteres etílicos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. Em 60 °C, o perfil de ésteres etílicos foi diferente

dos demais. A proporção de saturados neste caso foi 30,32% e 26,74% menor quando comparado aos de 45 e 90 °C, respectivamente. Porém, observa-se uma proporção maior de ésteres insaturados nesta temperatura, mais notadamente de poliinsaturados. Branco (2013), apresentou os resultados do perfil de ésteres etílicos obtidos a partir da biomassa liofilizada de *Scenedesmus sp.* e declarou que mais de 70% dos componentes são formados pela soma de C16:0, C16:1, C18:2 e C18:3. No entanto, as proporções destes componentes não são condizentes com os resultados aqui obtidos devido às altas proporções de C16:0 e C18:1, o que não aconteceu com os ésteres produzidos a partir da MD2. Os autores Im, Kim e Lee (2015) relataram um perfil de ésteres etílicos para *N. gatiana* contendo 31,7% de C16:1, de acordo com o alcançado neste estudo. Levine (2013) relatou 65% de C16:1 e 16% de C18:2 em ésteres etílicos de *Chlorella vulgaris*, num total de 81% .

A composição dos ésteres etílicos obtidos a partir da biomassa liofilizada da MD2 revelou que seu perfil graxo pode ser bem diferenciado quando comparado ao perfil graxo dos óleos vegetais e gorduras animais mais comumente usados para a produção de biodiesel. Por exemplo, os óleos de soja e de algodão podem apresentar em sua composição até 13,3% e 26,4% de ácido palmítico, respectivamente, e a composição do sebo bovino pode conter até 34,2% de ácido esteárico. Além destes ácidos graxos, os óleos de soja e de algodão e o sebo bovino contém ainda altos teores de ácido oléico (KNOTHE *et al.*, 2006). No entanto, para a MD2 as quantidades de ésteres etílicos derivados do ácido palmítico foi menor do que 0,6%, do ácido esteárico não chegou a 3% e do ácido oléico não foi detectado.

De acordo com Lôbo, Ferreira e Cruz (2009), algumas propriedades do biodiesel estão relacionadas com a estrutura de suas moléculas, como massa específica, viscosidade cinemática, índice de iodo, fração de destilados, número de cetano, ponto de névoa, ponto de entupimento de filtro a frio e ponto de fluidez. Segundo Singh *et al.* (2014), a alta estabilidade oxidativa aliada a um baixo ponto de entupimento de filtro a frio é preferível para o biodiesel. No entanto, existe uma relação inversa entre alta estabilidade oxidativa (conferido por compostos de maior saturação) e melhores propriedades de fluidez a frio (conferido por compostos de maior insaturação). De acordo com a explicação de Borsato *et al.* (2010), ésteres insaturados, como C18:2 e C18:3, podem ser facilmente oxidados, levando à formação de compostos como ácidos, aldeídos, ésteres, cetonas, peróxidos e alcoóis que, além de afetarem as propriedades do biodiesel, ocasionam problemas

no motor. De acordo com Borsato *et al.* (2010), a aplicação de antioxidantes sintéticos ao biodiesel aumenta a estabilidade do biocombustível, mantendo suas propriedades por um período maior. Logo, o fato dos ésteres produzidos na transesterificação *in situ* da MD2 serem majoritariamente formados por cadeias insaturadas, reduz a sua estabilidade e a sua densidade em relação aos ésteres majoritariamente saturados, favorecendo propriedades como viscosidade cinemática, ponto de ignição e ponto de entupimento de filtro a frio. Porém, a sua menor estabilidade oxidativa é um fator preocupante, pois esta característica pode influenciar na degradação do biodiesel.

6 CONCLUSÕES

A quantidade de biomassa da Mescla Devon's 2 (MD2) produzida nos fotobiorreatores apresentou bons rendimentos, chegando a ser 1,5 vezes maior do que a Mescla Devon's e 2,5 vezes maior do que a linhagem de *Desmodesmus subspicatus*, citados na literatura, demonstrando que este consórcio está mais fortemente adaptado ao sistema de tratamento de gases do que as culturas de microalgas empregadas anteriormente.

A eletroflotação demonstrou ser um processo rápido para a colheita de microalgas, mas manteve ainda uma grande quantidade de água ao final da operação. Foi preciso realizar uma etapa de sedimentação para a remoção da água antes da secagem da biomassa por liofilização.

A concentração de biomassa liofilizada foi muito inferior à concentração da suspensão de microalgas do fotobiorreator antes da eletroflotação. Isto se deve ao fato de que o equipamento opera por um tempo limitado, de modo que não ocorra a completa separação das microalgas. Assim, a biomassa residual é reintroduzida no fotobiorreator, formando um novo inóculo e dando continuidade ao tratamento do efluente gasoso.

A extração dos lipídeos da biomassa da MD2 nos tratamentos envolvendo os solventes polares (metanol e etanol) não apresentou diferença significativa entre si, atingindo valores de 18% (m/m). A extração com h-hexano (altamente apolar)

demonstrou que este solvente foi mais seletivo, chegando a 11,44% (m/m) com relação à biomassa, fato este relacionado às diferentes polaridades dos solventes.

O índice de acidez do extrato lipídico revelou um alto teor de ácidos graxos livres, característico do óleo de microalgas. Isto levou à escolha de um catalisador ácido para uso nos ensaios de transesterificação *in situ*.

A temperatura não foi um fator fortemente atuante na produção de ésteres a partir da transesterificação *in situ*, sendo os maiores rendimentos em ésteres obtidos aos 180 minutos, com valores muito próximos para todas as temperaturas de estudo.

Degradação de ésteres levou à quedas bruscas em seus rendimentos nas temperaturas mais elevadas até os 60 minutos de reação, principalmente aos 60 °C. Depois deste tempo, houve um aumento nos rendimentos em ésteres até os 180 minutos, com tendência de aumento. Isto pode estar relacionado a microvazamentos nos tubos de ensaio ou à volatilidade do solvente, No entanto, os motivos para este comportamento ainda deverão ser mais bem investigados.

A composição dos ésteres etílicos gerados na transesterificação *in situ* da MD2 revelou que seu perfil em ácidos graxos é muito diferenciado quando comparado ao perfil em ácidos graxos dos óleos vegetais, gorduras animais e óleos de outras culturas de microalgas citados na literatura.

Os ésteres obtidos são majoritariamente formados por cadeias insaturadas, o que favorece propriedades como viscosidade cinemática, ponto de ignição e ponto de entupimento de filtro a frio. Porém, seu uso como biodiesel pode apresentar problemas relacionados à sua estabilidade oxidativa.

7 SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

Considerando o aprendizado adquirido durante este trabalho e os resultados aqui apresentados, seguem algumas sugestões e recomendações que podem ser úteis para trabalhos futuros:

Buscar métodos para a desinfecção dos fotobiorreatores antes de ser feita uma nova inoculação, a fim de minimizar contaminações.

Realizar o estudo da curva de crescimento das microalgas nos fotobiorreatores e avaliar a produtividade diária de biomassa em peso seco.

Realizar a colheita das microalgas por eletroflotação seguida de centrifugação a fim de promover uma separação mais efetiva entre a biomassa e o meio de cultivo.

Estudar a aplicação de outros métodos para a extração dos lipídeos da biomassa de microalgas produzida e avaliar a composição dos lipídeos extraídos. Isto pode ser feito, por exemplo, por ultrassom ou microondas e combinando solventes com diferentes polaridades.

Estudar a produção de ésteres alquílicos por hidroesterificação *in situ* seguida da esterificação do óleo, empregando a biomassa úmida das microalgas, a fim de eliminar o gasto energético com a secagem da biomassa.

Realizar o balanço de massa e o balanço de energia do sistema para avaliar a eficiência do tratamento das emissões atmosféricas e a produção de biomassa de microalgas.

Avaliar o ciclo de vida da biomassa de microalgas produzida.

Elaborar uma proposta para a implantação de filtros biológicos usando microalgas para tratar os efluentes gasosos de outros estabelecimentos comerciais que utilizam a queima de carvão e lenha em suas atividades, como padarias e pizzarias, a fim de reduzir a carga de gases poluentes em ambientes urbanos.

REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10664: Águas - Determinação de resíduos (sólidos) - método gravimétrico. **ABNT**, Rio de Janeiro, 1989.

ABO EL-ENIN, S. A.; ATTIA, N. K.; EL-IBIARI, N. N.; EL-DIWANI, G. I.; EL-KHATIB, K. M. *In situ* transesterification of rapeseed and cost indicators for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.18, p.471-477, 2013.

ALVES, C. T. **Transesterificação de Óleos e Gorduras Residuais via rotas metálica e etílica utilizando o catalisador Aluminato de Zinco, em presença ou não de CO₂ supercrítico**. 2012, 213 p. Tese (Doutorado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ALVES SOBRINHO, R. C. M. **Síntese ésteres graxos a partir do processo de hidrólise seguido de esterificação da biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.*** 2012. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biodiesel. **ANP**, 2012. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1407413064193>>. Acesso em 04 jan. 2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Boletim Mensal do Biodiesel: agosto de 2014. **ANP**, 2014. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?pg=72218&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1409833684154>>. Acesso em 04 jun. 2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Boletim Mensal do Biodiesel: junho de 2015. **ANP**, 2015. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?pg=72218&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1409833684154>>. Acesso em 10 jul. 2015.

APROBIO - Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil. Maior uso de biodiesel fará do Brasil segundo maior produtor mundial. **APROBIO**, São Paulo, 2014. Disponível em <http://www.aprobio.com.br/noticia_new.aspx>. Acesso em 03 set. 2014.

ARAYA, B.; GOUVEIA, L.; NOBRE, B.; REIS, A.; CHAMY, R.; POIRRIER, P. Evaluation of the simultaneous production of lutein and lipids using a vertical alveolar panel bioreactor for the three *Chlorella* species. **Algal Research**, v.6, p.218-222, 2014.

ARIAS PEÑARANDA, M. T.; MARTÍNEZ ROLDÁN, A. J.; CAÑIZARES VILLANUEVA, R. O. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del

cultivo que afectan la producción de lípidos. **Acta Biológica Colombiana**, v.18, n.1, p.43 - 68, 2013.

ASTM - American Society for Testing and Materials. Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration. ASTM D664-04, **ASTM**, 2004.

ASHOKKUMAR, V.; RENGASAMY, R.; DEEPALAKSHMI, S.; SIVALINGAM, A.; SIVAKUMAR, P. Mass cultivation of microalgae and extraction of total hydrocarbons: A kinetic and thermodynamic study. **Fuel**, v.19, p.308-312, 2014.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o brasil**. 2012, 171p. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

AZEVÊDO, S. H. G. **Extração enzimática de óleo e produção *in situ* de biodiesel a partir da *Moringa oleífera* Lam.** 2013, 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

BALEN, M. **Aditivos melhoradores das propriedades de fluxo a frio em biodiesel**. 2012, 83p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. **CRC Press**, Boca Raton, Flórida, 2014.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). **Ed. RiMa**, 502 p., São Carlos, 2006.

BJERK, T. R. **Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis**. 2012, 105p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012.

BORSATO, D.; GUEDES, C. L. B.; MOREIRA, I.; PINTO, J. P.; DIAS, G. H.; SPACINO, K. R. Otimização das condições de obtenção de biodiesel de óleo de soja utilizando o delineamento experimental de mistura. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.1, p.3-13, Londrina, 2010.

BRANCO, K. B. Z. F. **Estudo da transesterificação *in situ* da microalga *Scenedesmus sp.* visando a síntese de ésteres para produção de biodiesel**. 2013, 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

BRANDÃO, K. S. R.; SILVA, F. C.; NASCIMENTO, U. M.; SOUSA, M. C.; MOUZINHO, A. M. C.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; MOURA, K. R. M.

Produção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Soja com Misturas de Metanol-Etanol. **Ageitec: Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. 2010. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Transesterifica%25E7%25E3o+1_000g76oadw902wx5ok0wtedt36958h0l.pdf>. Acesso em 06 ago. 2015.

BRASIL. Lei nº. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Presidência da República**, Brasília, 2005. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em 08 set. 2013.

BRASIL. Medida Provisória nº. 647, de 28 de maio de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, e dá outras providências. **Presidência da República**, Brasília, 2014. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato20112014/2014/Mpv/mpv647.htm>. Acesso em 01 de julho de 2014.

BRUICE, P. Y. Química Orgânica. 4a.ed, v.2. **Pearson Prentice Hall**. São Paulo, 2006.

BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 91(1), p.31–46, 2011.

BUOSI, G. M. **Extração do óleo do abacate (*Persea americana* Mill.) visando à produção de biodiesel e sua caracterização**. 2013, 48p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, V.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.339-347, Santa Maria, 2010.

CARVALHO JUNIOR, R. M. **Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalgas por metanólise *in situ***. 2010, 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CASTRO, P. R. C.; GUTIERREZ, L. E. Teores de aminoácidos e fenóis em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. cv. 'IAC-17') sob ação de reguladores vegetais. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v.36, Piracicaba, 1979.

CAVALCANTI, R. N.; FOSTER-CARNEIRO, T.; GOMES, M. T. M. S.; ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M.; MEIRELES, M. A. A. Uses and applications of extracts from natural sources. **RSC Green Chemistry**, n.21, Cambridge, 2013.

CAVALCANTI, V. F.; LEAL, B. E. S.; PRADO, M. R.; SAKUMA, A. C.; PEGORARO, L. A.; RAMOS, L. P. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de placas planas e produção de ésteres por transesterificação *in situ*. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.3, p.244-254, 2014.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, n.72, p.71-81, 2011.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. ed.1 Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 246p., 1997.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, V.101, N.9, p.3097–3105, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25, p.294-306, Palmerston North, 2007.

CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F. RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v.34, n.3, São Paulo, 2011.

D'AQUINO, C. A.; SCHROEDER L. **Proposta de sistema de baixo custo para cultivo de microalgas**. 2009, 102p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; MORÓN-VILLARREYES, 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**, n.35, p.1533-1538, 2011.

DEMIRBAS A. Production of biodiesel from algae oils. **Energy Sour Part A – Recov Utili Environ Eff.**, v31, n.2, 2008.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; DE CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1959-1967, Santa Maria, 2006.

DIB, F. H. **Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um moto-gerador**. 2010, 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira - SP, 2010.

DIFUSA, A.; MOHANTY, K.; GOUD, V. V. Advancement and challenges in harvesting techniques for recovery of microalgae biomass. In: Environmental sustainability - Role of green technology. **Springer**, New Dheli, India, 2015.

DOMINGUES, J.; DA SILVA, I. M.; DE ANDRADE, E. T.; FERREIRA, F. Extração do óleo, produção e caracterização de propriedades físicas do biodiesel de sementes de maracujá - *Passiflora edulis*. **Engevista**, v.16, n.1, p.1-7, 2014.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the *in situ* transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v.89, p.677-684, 2010.

ENDERLE, T. Microalgae production with aquaculture cycle water. **Algae Observer**, 2013. Disponível em <<http://www.algaeobserver.com/photobioreactor-microalgae-production-aquaculture-cycle-water#more-3351>>. Acesso em 03 dez. 2014.

FARIAS, S.P.; ALVES SOBRINHO, R. C. M.; VAUCHINSKY, L.; D'OCA, M. G. M.; Estudo da influência do solvente extrator no índice de acidez da fração lipídica da microalga *Chlorella sp.* In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: SBQ, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed., v.1. **ANVISA**, Brasília, 2010. 546p.

FERREIRA, J. G.; SILVA, C.; ARROYO, P. A. Reação *in situ* de microalgas (*Chlorella vulgaris*) utilizando etanol em condições pressurizadas em meio livre de catalisador. In: SIMPÓSIO DE BIOENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS DO MERCOSUL, 2., 2014, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SIMBIOMERCOSUL, 2014.

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**, 36(3), p.275-287, 2013.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, p.437-448; 2013.

FREITAS, D. D.; THOMÉ, O. S. S.; BORDEAUX-REGO, R. Avaliação do impacto da variação da concentração do biodiesel no diesel para a rentabilidade do negócio no mercado brasileiro. **Relatórios de Pesquisa em Engenharia de Produção**, v.13, n.4, pp.42-53, Niterói, 2013.

GA, V. K.; WOONYONG, C.; DOHYUNG K.; SHINYOUNG L.; HYEONYONG L. Enhancement of biodiesel production from marine alga, *Scenedesmus sp.* through *in situ* transesterification process associated with acidic catalyst. **BioMed Research International**, v. 2014, 11 p., 2014.

GARCIA-PLAZAOLA, J. I.; ESTEBAN, R. ; MATSUBARA, S.; NICOTRA, A. Determination of chlorophylls and carotenoids by HPLC. **PrometheusWiki**, 2012. Disponível em <<http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=Determination+of+chlorophylls+and+carotenoids+by+HPLC>>. Acesso em 17 fev. 2015.

GEHLING, R. 2007, 81p. **Alternativas à matriz energética brasileira: o caso do biodiesel**. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas) - Departamento de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GOUVEIA, L. Microalgae as a feedstock for biofuels. **Springer**, London, 2011.

GREGORY, J., DUAN, J. Hydrolyzing metal salts as coagulants. **Pure and Applied Chemistry**, n.73, p.2017-2026, 2001.

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

GUERRA, E. P.; FUCHS, W. Biocombustível renovável: uso de óleo vegetal em motores. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v.8, n.1, p.103-112, Curitiba, 2010.

GUERRA, R. A. T.; KANAGAWA, A. I.; DOS SANTOS, C. F.; DA SILVA, F. S.; DE SOUZA, F. B.; CAVALCANTI, G. A.; LUBENOW, J. A.; DA SILVA, M. B.; NEVES, M. A.; MENEZES, R. Cadernos Cb Virtual. **Ed. Univ.**, v.2, 610p., João Pessoa, 2011.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.; LABBÉ, J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. **Rev. Biol. mar. Oceanogr.** v.49, n.2, Valparaíso, 2014.

HARRINGTON, K. J.; DARCY-EVANS, C. Transesterification in situ of sunflower seed oil. **Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.**, 24 (2), pp-314–318, 1985.

HIDALGO, P.; TORO, C.; CIUDAD, G.; NAVIA, R. Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** v.12, p.179–199, 2013.

HUO, S.; WANG, Z.; ZHU, S.; CUI, F.; ZOU, B.; YOU, W.; YUAN, Z.; DONG, R. Optimization of Alkaline Flocculation for Harvesting of *Scenedesmus quadricauda* #507 and *Chaetoceros muelleri* #862. **Energies**, n.7, p.6186-6195, 2014.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **Inst. Adolfo Lutz**, 4a. ed., p.595-596, São Paulo, 2008.

IM, H.; KIM, B.; LEE, J. W. Concurrent production of biodiesel and chemicals through wet *in situ* transesterification of microalgae. **Bioresource Technology**, p.193, p.386–392, 2015.

JENA, U.; VAIDYANATHAN, N.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Evaluation of microalgae cultivation using recovered aqueous co-product from thermochemical liquefaction of algal biomass. **Bioresource Technology**, 2010.

KAKKAD, H.; KHOT, M.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A. Biodiesel production by direct *in situ* transesterification of an oleaginous tropical mangrove fungus grown on untreated agro-residues and evaluation of its fuel properties. **BioEnergy Research**, p.1-12, 2015. DOI: 10.1007/s12155-015-9626-x.

KANDA, H.; LI, P.; GOTO, M.; MAKINO, H. Energy-saving lipid extraction from wet *Euglena gracilis* by the low-boiling-point solvent dimethyl ether. **Energies**, n.8, p.610-620, 2015.

KASIN, F. H. ***In Situ* Transesterification of *Jatropha Curcas* for Biodiesel Production**. 2012, 169p. Thesis, Doctorate of Philosophy, School of Chemical Engineering and Advanced Material, Newcastle University, United Kingdom, 2012.

KIRAN, B.; KUMAR, R.; DESHMUKH, D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. **Energy Conversion and Management**, n.88, p.1228–1244, 2014.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. **Fátima/GTZ**, Florianópolis, 2004.

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

KOMOLAFE, O.; VELASQUEZ ORTA, S. B.; MONJE-RAMIREZ, I.; NOGUEZ, I. Y.; HARVEY, A. P.; ORTA LEDESMA, M. T. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. **Bioresource Technology**, n.154, p.297–304, 2014.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.3, 2003.

LEAL, B. E. S. **Oligossacarídeos prebioóticos a partir do pré-tratamento fosfórico da biomassa de microalgas utilizadas na biomitigação de CO₂ de efluente gasoso de churrascaria**. 2015, 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

LEMÕES, J. S. **Síntese de ésteres graxos de *Chlorella sp.* utilizando os processos de extração transesterificação e transesterificação *in situ***. 2011, 56p. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

LEVINE, R. B. **The production of algal biodiesel using hydrothermal carbonization and *in situ* transesterification**. 2013, 216p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Michigan, Michigan, 2013.

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.107-106, 2000.

LI, Y.; NAGHDI, F. G.; GARG, S.; ADARME-VEGA, T. C.; THURECHT, K. J.; GHAFOR, W. A.; TANNOCK, S.; SCHENK, P. M. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, 13:14, Brisbane, Australia, 2014.

LIMA, J. R. O.; DA SILVA, R. B.; DA SILVA, C. C. M.; DOS SANTOS, L. S. S.; DOS SANTOS JUNIOR, J. R.; MOURA, E. M.; DE MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Quím. Nova**, v.30, n3, São Paulo, 2007.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p.1596-1608, 2009.

LOPES, D. C.; MORAES, I.; SILVA, L. P.; CARVALHO, L. P.; PACIELLO, M. O. Cultivo de microalgas para a produção de biodiesel: potencial a ser explorado. **Revista Eletrônica de Energia**, v.4, n.1, p.65 -74, 2014.

LUO, J.; FANG, Z.; SMITH JR, R. L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, Japan, 2013.

MACEDO, L. S.; SILVA, J. G.; MELO, S. A. B. V.; TORRES, E. A. Produção de biodiesel a partir de misturas de óleo de mamona e óleo de babaçu com metanol via catálise alcalina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2009.

MARQUES, R. J. F. **Produção de biodiesel pelas microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis sp.*: otimização dos processos de pré-tratamento e conversão**. 2013, 68p. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente) - Departamento de Engenharia Geográfica, geofísica e energia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

MATOS, A. P.; MORIOKA, R. L. I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella sp.* cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Cienc. Rural**, v.45, n.2, Santa Maria, 2015.

MATTOS, R. A. **Estudo da influência de aditivos naturais nos pontos de entupimento a frio, de turbidez e de fulgor de biodiesel e de misturas diesel-biodiesel**. 2012, 318p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MCGROUP - Merchant Research and Consulting Ltd. Biodiesel: 2014 World Market Outlook and Forecast up to 2018. **MCGROUP**, Birmingham, 2014. Disponível em <<http://mcgroup.co.uk/researches/biodiesel>>. Acesso em 05 set. 2014.

MCMURRY, J. Química Orgânica. **Thomson**, 6^a. ed., combo, 2005.

MEDEIROS, G. A.; GONÇALVES, S. B.; RODRIGUES, D. S.; NETO, B. A. D. Enzimas e Líquidos Iônicos: Uma Combinação Promissora para um Biodiesel Limpo. **Rev. Virtual Quim.**, 5 (1), p.74-94, Brasília, 2013.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N.; Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, n.3, p.248-268, New Delhi, 2006.

MELO, M. C. C.; ZAMIAN, J. R. Produção de biodiesel a partir da transesterificação do óleo de semente de maracujá. **Rev. Cient. UFPA**, Belém, 2009.

MENEZES, R. S.; LELES, M. G.; SOARES, A.T.; BRANDÃO, P. I.; ANTONIOSI FILHO, N.. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de

matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química. Nova.** v.XY,p.1-6, 2013.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences.** v.15, Issue 2, p.160–176, 2015.

MICHELON, L. K. **Estudo de alternativa para separação de microalgas por eletroflotação.** 2011, 64p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MIKAMI, W. R. **Avaliação da eficiência de um sistema biológico para tratamento de emissões atmosféricas.** 2011, 62p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Env. Sc. Bio/Techn.**, v.12, Issue 2, p.165-178, 2013.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Biocombustíveis. **MMA**, Brasília, 2015. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/biocombustiveis>>. Acesso em 5 jan. 2015.

MME - Ministério de Minas e Energia. Balanço Energético Nacional 2013 - ano base 2012: relatório final. **MME**, Brasília, 2013. Disponível em <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2013.pdf>. Acesso em 24 dez. 2013.

MME - Ministério de Minas e Energia. Balanço Energético Nacional 2014 - ano base 2013: relatório final. **MME**, Brasília, 2014a. Disponível em <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2014.pdf>. Acesso em 25 ago. 2014.

MME - Ministério de Minas e Energia. Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis. Ed. nº.74, mar. 2014. **MME**, Brasília, 2014b. Disponível em <<http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>>. Acesso em 03 set. 2014.

MME - Ministério de Minas e Energia. Biodiesel. **MME**, Brasília, 2015. Disponível em <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/o_biodiesel.html>. Acesso em 05 jan. 2015.

MOEN, G. Anaerobic digester foaming: causes and solutions. **Water Environ Technol**, v. 15, n. 8, p. 70–73, 2003.

MOUSDALE, D. M. Biofuels: biotechnology, chemistry and sustainable development. **CRC Press**, Boca Raton, 2008.

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

NANOVOLTAICS, Inc. **Site Institucional**, 2014. Disponível em <<http://www.nanovoltaiacs.com/content/algae-photobioreactors>>. Acesso em 24 dez. 2014.

NASCIMENTO, U. M.; VASCONSELOS, A. C. S.; AZEVEDO, E. B.; SILVA, F. C. Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de coco babaçu com aquecimento por microondas. **Eclet. Quím.** v.4, n.4, São Paulo, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a. ed. **Artmed**, Porto Alegre, 2011.

OLIVEIRA, O. A.; SILVA, A. O. Compostos organometálicos. **EDUFRN**, 2006. Disponível em <<http://www.ccet.ufrn.br/otom/aula15.pdf>>. Acesso em 15 jul. 2015.

OLIVEIRA, K. C.; ZANIN, V. A bioeconomia e os biocombustíveis no cenário brasileiro. **Revista iPecege**, v.2, p.23-43, 2015

OLIVEIRA, L. C. C.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; BAPTISTA, P. M.; GONÇALVES, R. A.; CAMPOS, R. C. Determination of Na, K, Mg and Ca in biodiesel by LS F AAS and HR-CS F AAS: Studies that Supported the Proposal of the ABNT NBR 15556 Norm. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.23, n.7, p.1400-1408, 2012.

OMETTO, F. **Microalgae to energy: biomass recovery and pre-treatments optimisation for biogas production integrated with wastewater nutrients removal**. 2014, 256p. Thesis, Doctorate of Philosophy, School of Applied Sciences, Cranfield University, Cranfield, UK, 2014.

ORTIZ-RICO, A. **Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria**. 2014, 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Curitiba, Curitiba, 2014.

PEGORARO, L. A. **Informações sobre as microalgas** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida de <leandropegoraro@gmail.com> em 23 de julho de 2014.

PEGORARO, L. A. **Informações sobre fotobiorreatores da Devons** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida de <leandropegoraro@gmail.com> em 9 de abril de 2015.

PEREIRA, A. B. **Produção de biomassa e de lipídeos por cultivo misto de microalgas suplementado por CO₂**. 2013, 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Res.** 45(1), p.11-36, 2010.

RAMARAJ, S.; HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; GANESAN, V.; ANBAZHAGAN, C.; CARVALHO, I. S.; JUNTAWONG, N. Microalgae as an attractive source for biofuel

production. In: Environmental sustainability - Role of green technology. **Springer**, New Dheli, India, 2015.

RAMLUCKAM, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, n.116, p. 103-108, 2014.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Rev. Virtual Quim.**, v.3, n.5, p.385-405, 2011.

REIS, E. M. **Transesterificação *in situ* via etanolise do óleo de levedura para a produção de biodiesel**. 2013, 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

RIVERA, I.; VILLANUEVA, G.; SANDOVAL, G. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. **Grazas y Aceites**, (60), 5, p.468-474, Guadalajara, 2009.

RODRIGUES, L. L. R. **Biodiversidade de cianobactérias e algas das represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil**. 2008, 205p. Dissertação (mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROSA, J. M. C. **Modelação e optimização de uma unidade de produção de microalgas**. 2011, 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Rev CIATEC – UPF**, vol.4, n.1, p.48-60, 2012.

SCHROEDER, L. **Obtenção de ácidos graxos de biomassa úmida de microalgas através de saponificação**. 2013, 90p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SCHUTTEL, M. Microalgas podem ser solução para emissão de monóxido de carbono. **Blog Observatórios SESI/SENAI/IEL**, Curitiba, 2012.

SERIVE, B.; KAAS, R.; BÉRARD, J. B.; PASQUET, V.; PICOT, L.; CADORET, J. P. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, p.124, p.311–320, 2012.

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, 2008.

SHELEF, G.; SUKENIK, A.; GREEN, M. Microalgae harvesting and processing: a literature review. **Technical Report**, p.231-2396, Haifa, Israel, 1984.

SILER-MARINKOVIC, S.; TOMASEVIC, A. Transesterification of sunflower oil *in situ*. **Fuel**, v.77, n.12, p.1389-1391, 1998.

SILVA-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.** 2011, 124p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

SINGH, B.; GULDHE, A.; RAWAT, I.; BUX, F. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Ren. Sust. En. Rev.**, n. 29, p. 216-245, 2014.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Dingler's Polytechnisches Journal**, 232, p.461-465, 1879. Disponível em <<http://dingler.culture.hu-berlin.de/article/pj232/ar232136>>. Acesso em 07 jul. 2014.

SOUZA, C. L. **Estudo quantitativo e qualitativo de espuma acumulada em reatores uasb tratando esgotos domésticos.** 2006, 105p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 30(2), p.187-191, 2009.

STREIT, M. N.; CANTERLE, L. P.; DO CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Rev. Rural**, v.35, n.3, Santa Maria, 2005.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. M.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Quím. Nova**, v.30, n.3, São Paulo, 2007.

SUN Chlorella Corporation. **Site institucional**, 2008 Disponível em <<http://www.sunchlorella.com/corporate-activity.html>>. Acesso em 08 dez. 2014.

TAPANES, N. L. C. O, ARANDA, D. A. G., PEREZ, R. S., CRUZ, Y, R. Biodiesel no Brasil: matérias-primas e tecnologias de produção. **Acta Scientia & Technicae**, v.1, n.1, 2013.

TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná. Relatório final do projeto: Desenvolvimento de fotobiorreator para aproveitamento da emissão atmosférica proveniente da chaminé de churrascaria. **TECPAR**, Curitiba, 2012.

TRAJANO, M. F; MELLO, V. S; FAUSTINO, L.S.M; MOTTA, J.M; CARNEIRO, K.A.A. Reaproveitamento da Semente de Maracujá para Biocombustíveis. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOCMBUSTÍVEIS, 2., 2009, Recife. **Anais...** Recife: ABQ, 2009. Disponível em <<http://www.abq.org.br/biocom/2009/trabalhos/-4-4567.htm>>. Acesso em 27 set. 2014.

TRANSFORMATIVE Technologies 2010 nominees: Microalgae, cyanobacteria, lemna, and plankton. **Biofuels Digest**, 2010. Disponível em <<http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2010/06/07/transformative-technologies-2010->

nominees-microalgae-cyanobacteria-lemna-and-plankton/>. Acesso em 18 dez. 2014.

TREVISAN, E.; LEAL NETO, M.; MORO, P.; HOSHINO, S. O.; ARROYO, P. A. Avaliação dos solventes hexano e clorofórmio em reações de transesterificação *in situ* de *Chlorella vulgaris*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2013, Maringá. **Anais...** Maringá: CESUMAR, 2013. Disponível em <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit_mostra/Elias_Trevisan.pdf>. Acesso em 09 jul. 2015.

TÖWS, M. **Identificação de riscos à segurança do trabalhador na operação de remoção de odores - caso de uma churrascaria em Curitiba.** 2013, 51p. Monografia (Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho) - Departamento Acadêmico de Construção Civil, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

VANDAMME, D. **Flocculation based harvesting processes for microalgae biomass production.** 2013, 123p. Thesis, Doctorate of Philosophy, KU Leuven Faculty of Bioscience Engineering, Belgium, 2013.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v.31, n.4, p.233–239, 2013.

VELASQUES-ORTA, S. B.; LEE, J. G. M.; HARVEY, A. Alkaline *in situ* transesterification of *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, n.94, p.544-550, 2012.

VIÊGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VIEIRA, D. B. **Cultivo de *Chlorella sp.* em fotobiorreator suplementado com gás de incineração de resíduos sólidos perigosos e avaliação de sequestro de dióxido de carbono para produção de biomassa.** 2011, 92p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

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.

WU, J. J.; HONG, S. E.; WANG, Y. C.; HSU, S. L.; CHANG, C. M. J. Microalgae cultivation and purification of carotenoids using supercritical anti-solvent recrystallization of CO₂ + acetone solution. **J. of Supercritical Fluids**, n.66, p.333-341, 2012a.

WU, Z.; ZHU, Y.; HUANG, W.; ZHANG, C.; LI, T.; ZHANG, Y.; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v.110, p.496–502, 2012b.

YANG, F.; XIANG, W.; SUN, X.; WU, H.; LI, T.; LONG, L. A novel lipid extraction method from wet microalga *picochlorum* sp. at room temperature. **Mar. Drugs**, n.12, p.1258-1270, 2014.

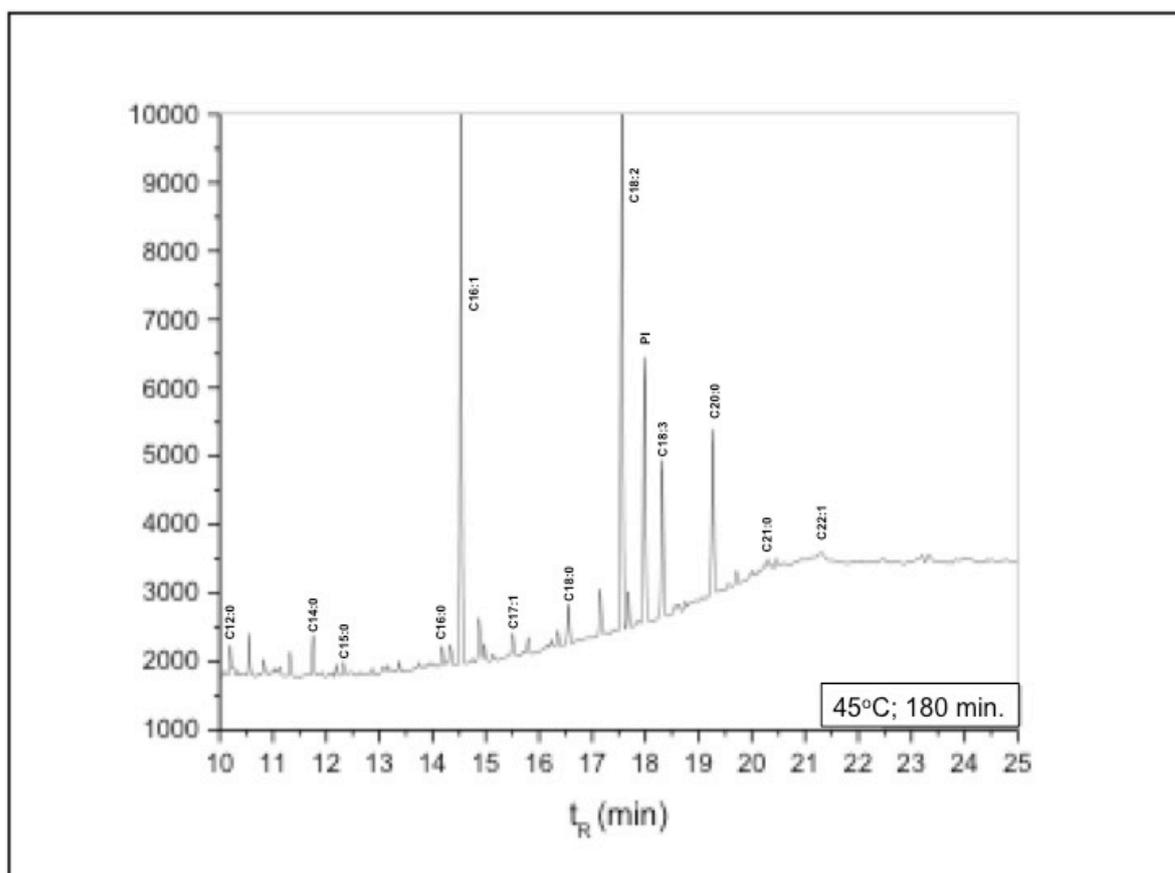
ZAGO, E. C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de Rizopus microsporus produzidas por fermentação no estado sólido**. 2010, 112p. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P. YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, n.47, p.4294-4302, 2013.

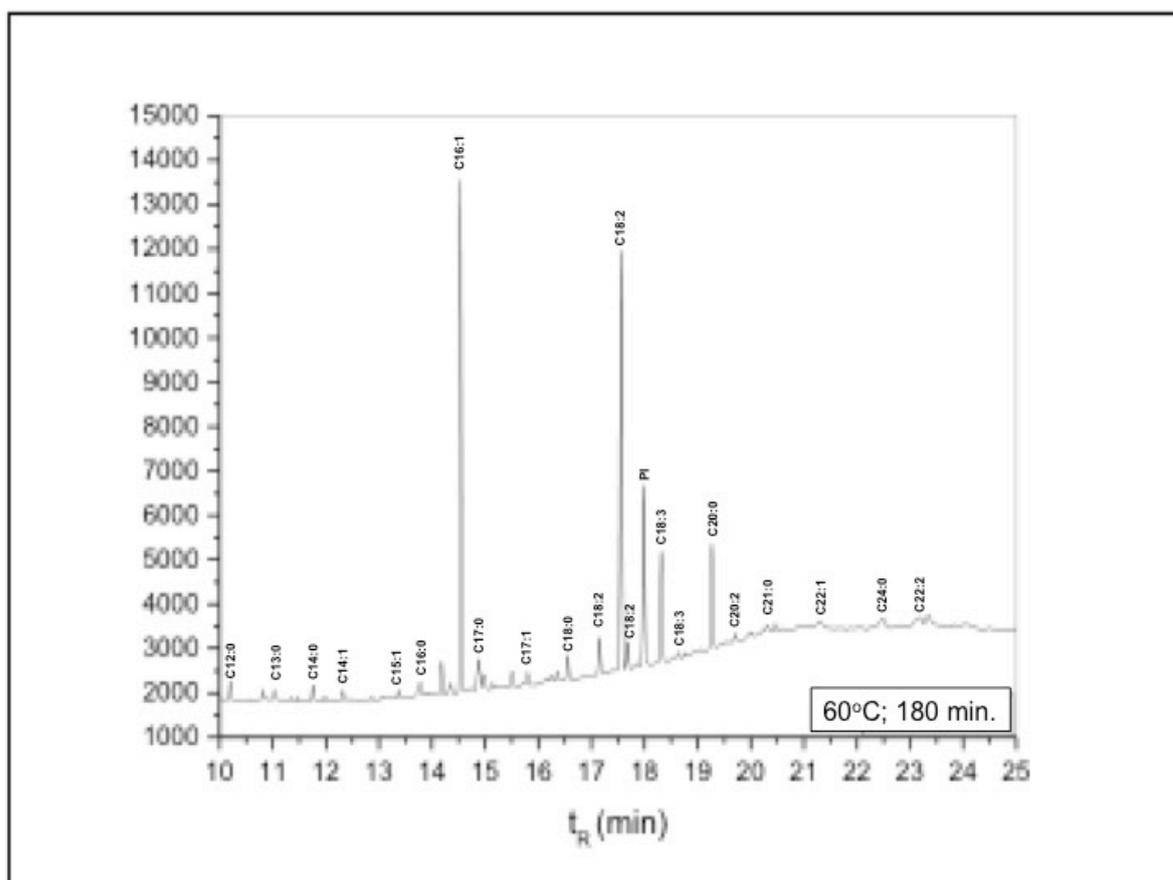
ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. M.; COIMBRA, J. S. R.; MARTINS, E. C. A.; SILVA, D. X.; TELIS-ROMERO, J. Revisão: propriedades físico-químicas do biodiesel. **Pesticidas: rev. ecotoxicol. e meio amb.**, v.21, p.55-72, Curitiba, 2011.

APÊNDICES

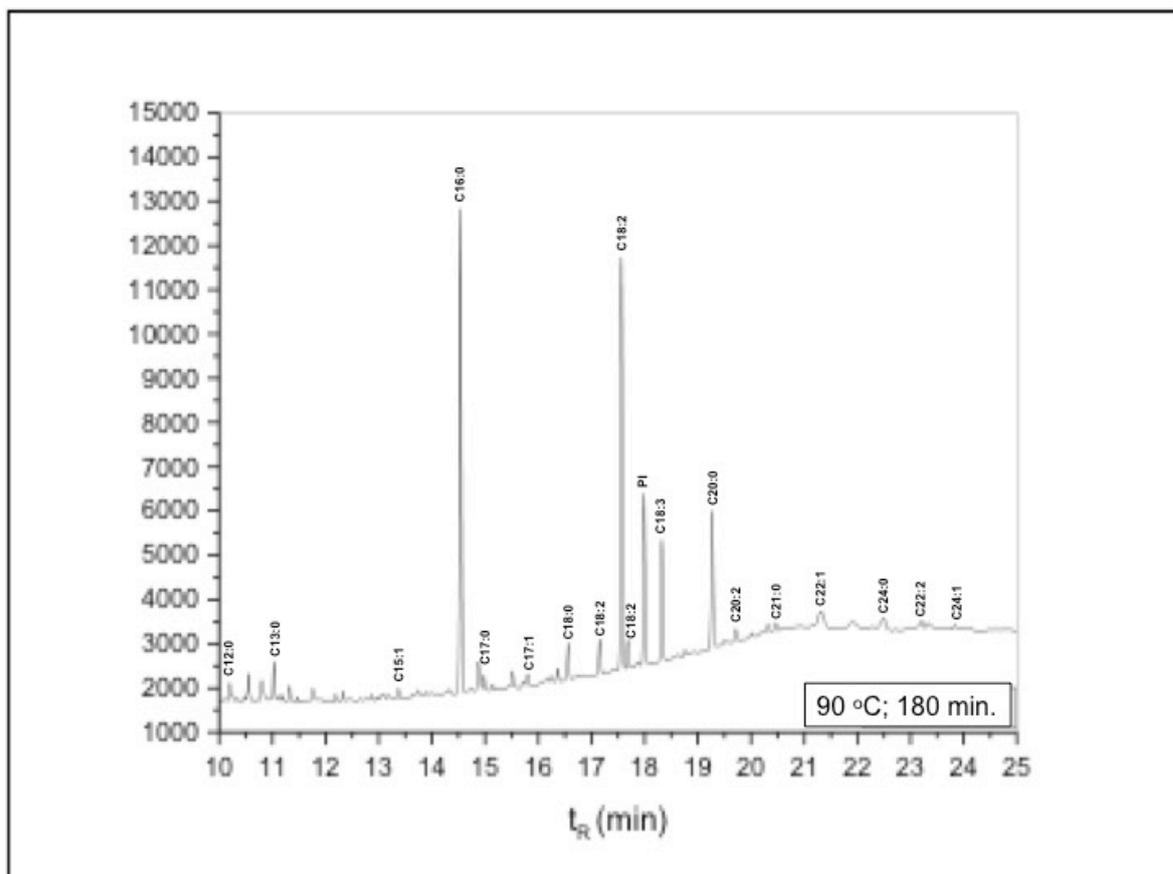
APÊNDICE 1 - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A 45 °C APÓS 180 MINUTOS.....	95
APÊNDICE 2 - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A 60 °C APÓS 180 MINUTOS.....	96
APÊNDICE 3 - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A 90 °C APÓS 180 MINUTOS.....	97



APÊNDICE 1 - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A 45 °C APÓS 180 MINUTOS.



APÊNDICE 2 - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A 60 °C APÓS 180 MINUTOS.



APÊNDICE 3 - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES ETÍLICOS PRODUZIDOS A 90 °C APÓS 180 MINUTOS.

