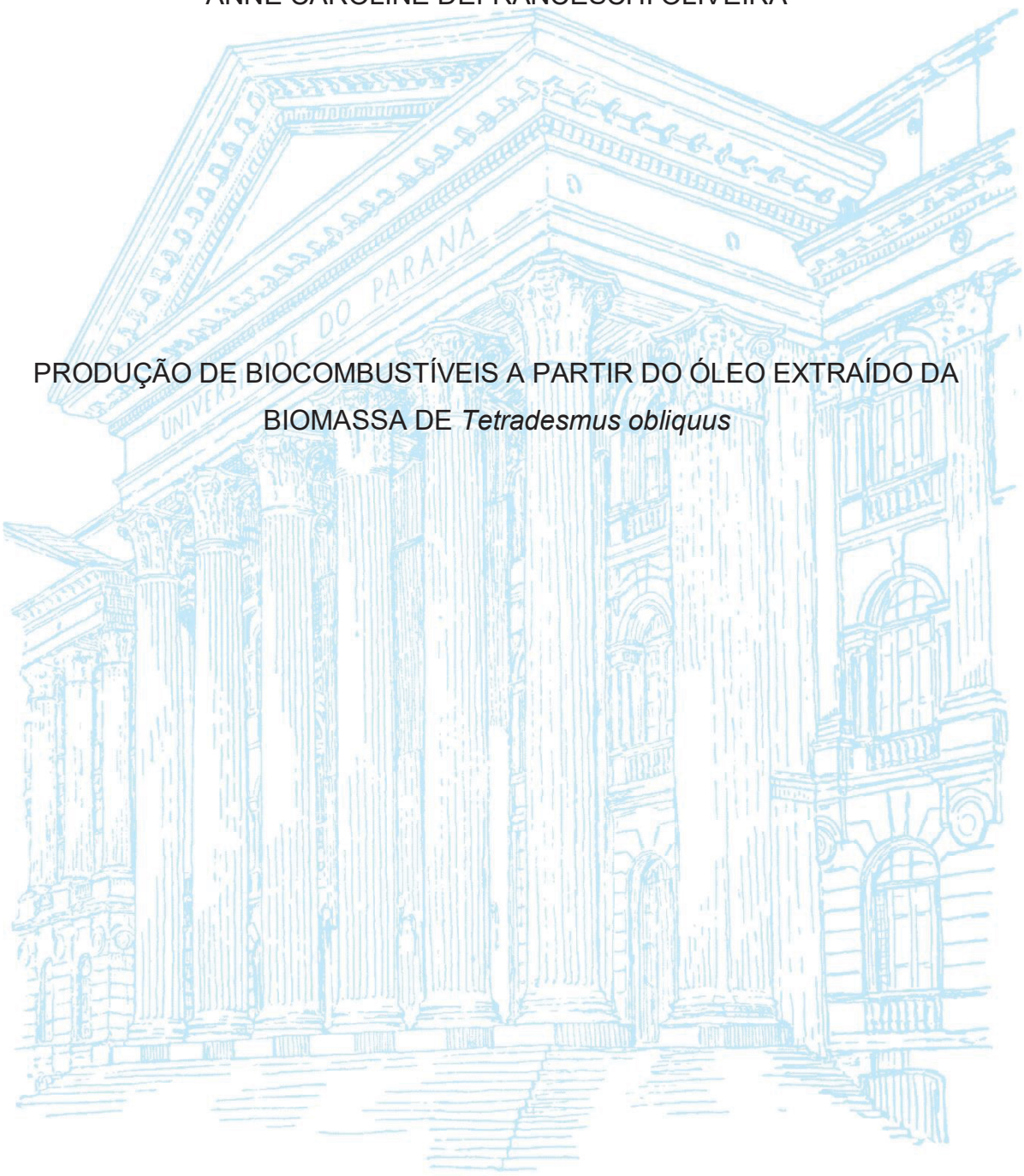
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNE CAROLINE DEFRANCESCHI OLIVEIRA



PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DO ÓLEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA DE *Tetradesmus obliquus*

CURITIBA

2022

ANNE CAROLINE DEFRANCESCHI OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DO ÓLEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA DE *Tetradesmus obliquus*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

CURITIBA
2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Oliveira, Anne Caroline Defranceschi
Produção de biocombustíveis a partir do óleo extraído da biomassa de Tetradesmus obliquus / Anne Caroline Defranceschi Oliveira. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: André Bellin Mariano

1. Biodiesel. 2. Microalga. 3. Lipídios. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. III. Mariano, André Bellin. IV . Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS - 40001016033P9

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANNE CAROLINE DEFRANCESCHI OLIVEIRA** intitulada: **Produção de biocombustíveis a partir do óleo extraído da biomassa de *Tetradesmus obliquus***, sob orientação do Prof. Dr. ANDRE BELLIN MARIANO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 15 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica
20/12/2022 21:06:55.0
ANDRE BELLIN MARIANO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
20/12/2022 14:56:43.0
JOSE VIRIATO COELHO VARGAS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/12/2022 10:16:07.0
PEDRO AUGUSTO ARROYO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica
20/12/2022 15:05:29.0
MARCOS LÚCIO CORAZZA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus pais, que me forneceram o suporte pra chegar até aqui.

Dedico

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, é quem faz as verdadeiras perguntas.

(Claude Lévi-Strauss)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre torcerem e incentivarem tudo que eu fiz na vida, incluindo este longo doutorado.

À minha amiga, orientadora, professora e linda Malú, pela ajuda na finalização e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas filhotas de quatro patas Jujuba e Chloe que são parceiras para todas as horas, umas fofas e parceiras da mamãe.

Aos meus amigos da vida toda Felipe, Cassi e Mah, por estarem comigo em todos os momentos.

Aos meus amigos do NPDEAS, Heloísa, Wellington, Ihana, Flávio, Iago, Diego e Elaine que tornaram a convivência no trabalho mais divertida.

Ao PRH-24 pelo apoio financeiro mediante bolsa na primeira parte deste trabalho.

A capes, pelo fornecimento de bolsa na reta final deste trabalho.

Aos colegas de NPDEAS e ao meu orientador André, pela confiança no meu trabalho.

RESUMO

A utilização de energias de fontes renováveis se torna cada dia mais necessária, e o Brasil como país que utiliza amplamente a malha rodoviária demanda pelo uso de biocombustíveis. O diesel é um combustível de natureza fóssil e não renovável portanto, seu uso excessivo pode levar a escassez. O biodiesel é um combustível renovável obtido através da reação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois primários como etanol e metanol. O objetivo deste trabalho foi extrair o óleo da microalga Tetradesmus obliquus, caracteriza-lo e realizar a síntese do biodiesel proveniente do óleo de microalgas. Para extração de lipídios da microalga foram testados diferentes métodos: extração a frio com solventes, a quente com solventes, saponificação e extração por fluido super crítico. O método que apresentou melhores teores de extração de ácidos graxos e material apolar foram os de extração a quente utilizando como solvente etanol e hexano (30:70) obtendo extração de 12,79% de material apolar total e destes 6,51% de ácidos graxos. As amostras obtidas a partir das extrações foram fracionadas através do processo de saponificação: material apolar insaponificável e material saponificável (ácidos graxos). Os ácidos graxos foram esterificados por catalise acida e enzimática e as amostras das duas frações foram submetidas a cromatografia gasosa com detector de massa acoplado para identificação dos compostos de cada amostra. A amostra de ácidos graxos apresentou predominância do ácido graxo C16 palmítico, e dos ácidos graxos C18 oleico, linoleico, linolênico e esteárico. A fração de insaponificáveis apresentou hidrocarbonetos de cadeia longa, como o heptadecano (cerca de 30% de área do cromatograma), mas também em menor quantidade estava presente o octadecano, e um composto naftênico. Os ésteres obtidos através da catalise enzimática tiveram percentual de conversão de 91,3%, enquanto na catalise química houve conversão total, porém, a pureza alcançada após purificação em bauxita foi de 79 e 82%, respectivamente. A análise do ciclo de vida foi realizada para avaliar os impactos ambientais gerados pelos processos empregados neste trabalho, sendo o processo de saponificação o processo mais agressivo ambientalmente devido à alta geração de resíduos durante o processo e a impossibilidade de reutilização da biomassa e reagentes. O óleo obtido da microalga T. obliquus mostrou-se uma alternativa interessante para a geração de biocombustíveis, e novos estudos de purificação dos ésteres e hidrocarbonetos obtidos devem ser realizados a fim de obter altos níveis de pureza para aplicabilidade dos combustíveis.

Palavras-chave: microalga, biodiesel, métodos de extração de lipídios.

ABSTRACT

Every day the use of renewable energy sources becomes more necessary, and Brazil is a country that widely utilizes it's road network demands using bio fuels. Diesel is a fossil fuel in its nature so, therefore, its excessive use can lead to shortages. The Bio Diesel is a renewable fuel obtained through the reaction of vegetable oils or animal fats with primary alcohols like ethanol and methanol. This studies objective was to extract oil from the micro algae *Tetradesmus obliquus*, to categorize it and to synthesize bio diesel from micro algae's oil. To extract the lipids from micro algae different methods were tested: cold oil extraction with solvents, hot extraction with solvents, saponification and extraction with super critic fluid. The method that showed best levels of fatty acids extraction and non-polar material were the hot extraction using ethanol and hexane as solvent (30:70) obtaining a 12,79% extraction rate of non-polar material in total from what 6,51% were fatty acids. The samples obtained from the extraction were fractionated through the process of saponification: unsaponifiable non-polar material and unsaponifiable material (fatty acids). The fatty acids were esterificated through acid catalysis and enzymatic catalysis and the samples of the two fractions were submitted to a gas chromatography with a mass detector coupled to identify each sample composites. The sample of fatty acids showed predominance of palmitic C16 fatty acid, and oleic C18 fatty acids, linoleic, linolenic and stearic. The fraction of the unsaponifiable showed long chain hydrocarbons like heptadecane (about 30% of the chromatogram area), but also, to a lesser extent, octadecane and a naphthenic compound were present. The esters obtained through enzymatic catalysis had a conversion rate of 91,3% meanwhile the chemical catalysis had a complete conversion, although, it's purity rate after bauxite purification reached between 79 and 82%, respectively. The life cycle analysis was carried to assess the environment impacts generated by the processes employed in this work, with the saponification process being the most environmentally aggressive process due to the high generation of waste during the process and the impossibility of reusing biomass and reagents. The oil obtained from the microalgae *T. obliquus* proved to be an interesting alternative for the generation of biofuels, and new purification studies of the esters and hydrocarbons obtained must be carried out in order to obtain high levels of purity for the applicability of the fuels

Key-words: microalgae, biofuel, lipid extraction methods.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico da produção de biodiesel por microalgas (adaptado de FARIED et al., 2017) 17

Figura 2. Representação esquemática do extrator Soxhlet 19

Figura 3. Representação dos processos aplicados na extração por solventes de microalgas, onde, (a) é o cultivo em fotobiorreatores, (b) concentração da biomassa por centrifugação, (c) secagem em estufa, (d) moagem, (e) mistura de solventes e biomassa, (f) filtragem do material filtrado e (g) concentração da amostra extraída através da destilação do solvente 20

Figura 4. Reação de saponificação 21

Figura 5. Esquema representativo do processo de extração por fluido supercrítico utilizando CO_2 e cossolvente 22

Figura 6. Reação de esterificação 24

Figura 7. Reação de transesterificação 25

Figura 8. Fotobioreatores utilizados para produção de microalgas no NPDEAS 29

Figura 9. Cromatograma CG-MS do biodiesel de microalgas purificado em coluna de bauxita 41

Figura 10. Produtos obtidos da extração da microalga *T. obliquus*, onde (A) é o óleo bruto obtido da extração por solventes, (B) é a fração de lipídios saponificáveis, (C) é a fração insaponificável e (D) são os ésteres após a reação de esterificação da fração B purificados em argila de bauxita 43

Figura 11. Cromatograma CG-MS da fração de lipídios insaponificáveis da microalga *T. obliquus* 45

Figura 12. Fluxograma de todos os processos experimentais avaliados através da Análise do Ciclo de Vida 47

Figura 13. Comparação do impacto gerado pelos métodos de extração e esterificação avaliados experimentalmente, sendo: (A) Biodiesel enzimático de microalgas (Extração a Quente), (B) Biodiesel enzimático de microalgas (Extração a Frio), (C) Biodiesel enzimático de microalgas (Saponificação Direta), (D) Biodiesel químico de microalgas (Extração a Quente), (E) Biodiesel químico de microalgas (Extração a Frio), (F) Biodiesel químico de microalgas (Saponificação Direta) 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de material apolar e de ácido graxo extraídos por solventes à quente 36

Tabela 2. Percentual de material apolar e de ácido graxo extraídos por solventes a frio 37

Tabela 3. Percentual de material apolar e de ácido graxo extraídos por fluido supercrítico 38

Tabela 4. Comparação dos melhores resultados de cada método e balanço energético 42

Tabela 5. Impacto gerado pelos métodos de extração e esterificação avaliados experimentalmente 51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACV	Análise do Cico de Vida
ANP	Agência Nacional do Petróleo
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CG-MS	Cromatógrafo gasoso com detetor de massa
CO_2	Dióxido de carbono
EPA	*Environmental Protection Agency*
FAME	Fatty Acid Methyl Esther
HCl	Ácido clorídrico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
ISO	*International Organization for Standardization*
KJ	Quilojoule
Log P	Polaridade do solvente
m^2a	metro quadrado por área
m^2	metro quadrado
m^3	metro cúbico
MRI	*Midwest Research Institute*
MJ	Mega Joule
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônia
pNPP	Palmitato de p-nitrofenila
PVA	Álcool polivinílico
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm	Rotações por minuto
U	Unidades de atividade enzimática

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 14
2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 16
2.1 Microalgas 16
2.2 Métodos de extração de óleo 17
2.2.1 Soxhlet 19
2.2.2. Extração química 19
2.2.3. Saponificação 20
2.2.4. Prensagem 21
2.2.5. Extração por líquido pressurizado 21
2.2.6. Extração por fluído supercrítico 22
2.3 Biodiesel de microalgas 23
2.4 Análise do ciclo de vida 25
3. **OBJETIVOS** 27
4. **MATERIAIS E MÉTODOS** 28
4.1 Reagentes 28
4.2 Biomassa de microalgas 28
4.3 Otimização da extração do óleo da microalga *Tetradesmus obliquus* 29
4.3.1 Extração à quente com solventes orgânicos 29
4.3.2 Extração à frio com solventes orgânicos 30
4.3.3 Extração com fluído supercrítico 30
4.3.4 Extração em meio aquoso via saponificação 31
4.4 Fracionamento e caracterização do óleo obtido pelos diferentes métodos de extração 31
4.4.1. Fracionamento 31
4.4.2. Caracterização 32
4.5 Esterificação do óleo de microalgas 32
4.6 Análise dos ésteres obtidos 33
4.6.1 Método de Lowry-Tinsley 33
4.6.2 Cromatografia Gasosa 33

4.6.3 Balanço energético 34
4.7 Análise do ciclo de vida 34
5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 35
5.1. Otimização da extração do óleo de microalgas 35
5.1.1. Extração à quente com solventes orgânicos 35
5.1.2. Extração à frio com solventes orgânicos 36
5.1.3. Extração com fluído supercrítico 38
5.1.4. Extração em meio aquoso via saponificação 40
5.2. Caracterização e fracionamento do óleo de microalgas 43
5.3. Esterificação enzimática e química do óleo de microalgas 46
5.4. Análise do ciclo de vida 47
6. **CONCLUSÃO** 53
7. **REFERÊNCIAS** 55
8. **LISTA DE APÊNDICES** 61

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país dependente de sua malha rodoviária para abastecimento e distribuição de insumos tornando o diesel peça chave para este processo. O diesel é um combustível de natureza fóssil e não renovável portanto, seu uso excessivo pode levar a escassez. O desenvolvimento de novos combustíveis de natureza renovável tem sido um assunto cada vez mais presente nos dias atuais.

O biodiesel é um combustível renovável obtido através da reação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois primários de cadeia curta, como etanol e metanol. Os produtos desta reação são glicerina e ésteres, que após um processo de purificação para atender as especificações de qualidade podem ser utilizados como biodiesel. Desde 2003, o Brasil vem estudando implementar uma política de adição de biodiesel ao diesel convencional, sendo sua mistura facultativa ao diesel até o ano de 2008, onde porcentagens pré-estabelecidas passam a ser obrigatórias (OLIVEIRA, 2013).

Com o aumento gradativo da utilização do biodiesel, uma preocupação com suas fontes de matéria-prima vem crescendo, pois seu fornecimento contínuo é um dos fatores mais importantes. O Brasil utiliza como principal matéria-prima o óleo de soja, mas problemas como o da entressafra e o uso de áreas agricultu̇ráveis destinadas à produção de alimentos torna questionável o uso desta matéria-prima, bem como a questão de safra e entressafra.

A utilização de microalgas para obtenção de óleo para a produção de biodiesel, vem sendo uma ideia cada vez mais cogitada, pois apresenta vantagens como: a redução da área necessária para a obtenção da biomassa, além de não haver disputa pela área agricultu̇rável destinada a produção de alimentos (RAVANIPOUR et al., 2021).

Microalgas podem ser microrganismos unicelulares ou pluricelulares com capacidade fotossintética e necessidades nutricionais simples, que podem ser supridas até mesmo a base de resíduos agroindustriais. O cultivo de microalgas foi destinado inicialmente a suplementação nutricional e a

recuperação de águas degradadas, porém ao longo do tempo estes organismos começaram a despertar atenção devido ao seu alto teor de lipídios presente em sua biomassa e uma nova perspectiva de utilização para desenvolvimento energético começou a ser explorada (DEL RÍO *et al*., 2015; LEESING *et al*., 2013; ZHANG *et al*., 2022).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

Microalgas são microrganismos capazes de realizar fotossíntese, que podem incluir cianobactérias. O número espécies de microalgas existentes pode chegar a 1 x 10^6, e estes organismos despertam interesse em diversos segmento (agroindustrial, nutricional, bioenergético e de alimentação animal, dentre outros) devido a sua produção de metabólitos como lipídios, polissacarídeos, proteínas, hidrocarbonetos e minerais (ZHOU et al., 2022).

As microalgas são capazes de apresentar três metabolismos distintos frente a fonte de carbono disponível para crescimento: o metabolismo autotrófico, onde na presença de luz e determinados sais minerais a microalga é capaz de fixar dióxido de carbono; o metabolismo heterotrófico, onde a microalga necessita de uma fonte de carbono orgânica presente no meio de cultivo na ausência de luminosidade e o metabolismo mixotrófico, onde são desenvolvidas em conjunto as duas formas metabólicas anteriores (GAO et al., 2010).

Além do uso para a produção de biodiesel, as microalgas são importantes fontes de triacilgliceróis e compostos de alto valor, como carotenóides e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. Os triacilgliceróis são matérias-primas para biocombustíveis ou óleos comestíveis; os carotenóides são usados como pigmentos nas indústrias de alimentos e rações; e os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são benéficos para a saúde humana, sendo também fundamentais para o correto desenvolvimento de peixes na aquicultura. A regulação da produção e acúmulo destes compostos dependem frequentemente de estímulos ambientais comuns, como luz e temperatura. Assim, futuras pesquisas sobre como as microalgas percebem e respondem ao estresse ambiental serão cruciais para entender como a biossíntese e o armazenamento dessas moléculas lipofílicas são reguladas (CHHANDAMA et al., 2021; SCHÜLER et al. 2017).

Como pode ser observado na Figura 1, são várias etapas envolvidas na produção de biodiesel de microalgas. O primeiro passo é o crescimento de espécies

de microalgas apropriadas que incluem o processo de cultura de fotobiorreatores. O segundo passo é a preparação. O primeiro processo na fase de preparação é a recuperação das algas cultivadas, seguido pelo processo de concentração destas. Posteriormente, as microalgas concentradas tem seu excesso de água é removido. O último passo envolve tanto o processo de extração de óleo e outros compostos de interesse, para finalmente ser realizada a síntese de biodiesel (FARIED et al., 2017).

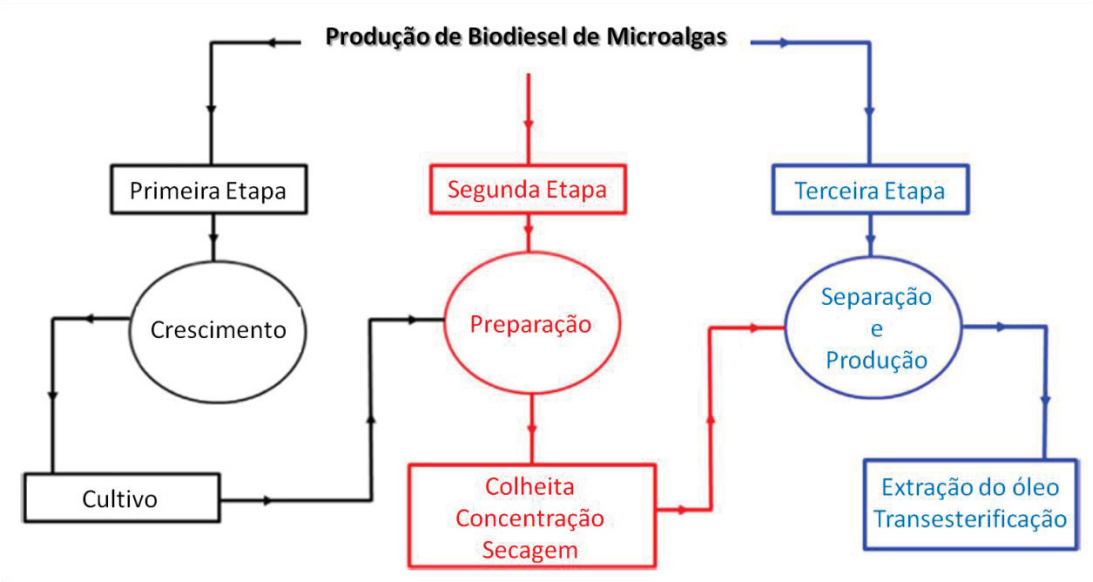


Figura 1. Gráfico da produção de biodiesel por microalgas (adaptado de FARIED et al., 2017).

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO

Para eficaz extração do óleo de microalgas, se faz necessário o estudo de diversos processos de extração e pré-tratamento para chegar a melhor condição de obtenção deste material. O método de extração escolhido deve conseguir retirar o máximo possível de material graxo presente na biomassa de microalgas. Cada espécie destes microrganismos varia quanto à quantidade e tipo de material produzido, sendo isso, ligado não só a espécie escolhida, mas também a condição que esta foi cultivada. Cada solvente, ou mistura de solventes será capaz de extrair diferentes lipídios da microalga escolhida (LÓPEZ *et al*., 2013, REHMAN *et al*., 2022)

Os lipídios presentes nas microalgas podem ser polares ou neutros. Os polares são os lipídios constitucionais como fosfolipídios e glicolipídios, que geralmente estão presentes na membrana celular e organelas. Os lipídios neutros são basicamente compostos por triacilgliceróis. Cada espécie de microalga irá apresentar uma composição lipídica específica e esta pode variar ou mesmo ser induzida por diferentes tipos de nutrientes e cultivos oferecidos aos organismos durante seu crescimento (ZHOU et al., 2022).

O princípio básico da extração de lipídios é de interação química entre o material lipídico e o solvente. Os lipídios são armazenados na célula na forma de gotículas aglomeradas, e com a passagem do solvente apolar pela membrana celular, forma-se um complexo lipídio-solvente mantido pela fraca interação gerada pela força de Van der Waals. Este complexo migra em relação ao gradiente de concentração, mas apenas uma pequena parte consegue atravessar a membrana celular, pois através de ligações de hidrogênio outras moléculas como carboidratos e proteínas ligam-se ao complexo lipídico, tornando difícil a passagem pela membrana (FLORENTINO et al., 2014; HALIM *et al*., 2012).

Wu et al. (2017) testaram onze co-solventes diferentes para a extração do óleo da microalga *Chlorella sp.* e obtiveram alta eficiência de conversão com a adição de t-butanol (79.69%), seguida pelo co-solvente MTBE (77.66%), éter (71.25%), acetona (53.05%), hexano (51.81%) e iso-propanol (39.19%). Os autores concluem que além da melhoria da eficiência de contato entre a lipase e os substratos, a introdução de alguns alcoóis graxos, como os butanóis, também poderia proteger potencialmente as lipases das desnaturações causadas pelo metanol tóxico. Para a escolha do co-solvente mais adequado deve-se levar em consideração a polaridade, os grupos funcionais e a estrutura molecular do solvente. Além disso, neste trabalho, Wu et al. (2017) consideraram o preço, os impactos ambientais dos solventes e as melhores taxas de conversão, chegando à conclusão que o co-solvente mais adequado para uma produção comercial de biocombustível algal seria t-butanol.

A seguir são apresentados alguns dos métodos de extração que podem ser aplicados no processo de obtenção do óleo de microalgas.

2.2.1 Soxhlet

O método de extração via Soxhlet (Figura 2) foi proposto no ano de 1879, com a finalidade de quantificar os lipídios totais do leite. Nesse método, a amostra é submetida sucessivas vezes ao contato com o solvente, tendo como principal vantagem a passagem do solvente puro pela amostra a cada reciclo, sem a possibilidade de saturação deste. O método apresenta desvantagens, e a principal é longo tempo de extração (RAVANIPOUR et al., 2021).

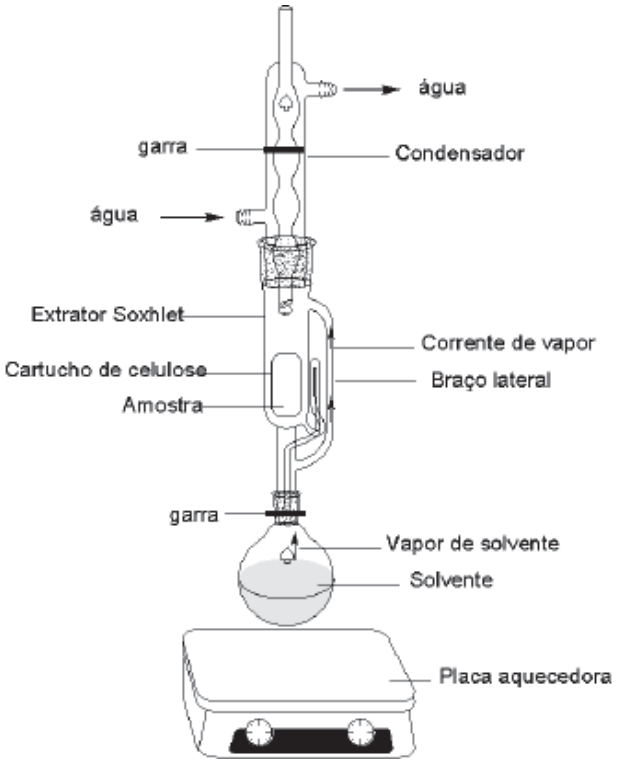


Figura 2. Representação esquemática do extrator Soxhlet.

2.2.2 Extração química

Este método basicamente trata da extração dos lipídios através de solventes. A biomassa entra em contato constante com o solvente, podendo variar o tempo e a agitação. Solventes orgânicos são os mais aplicados neste método, com destaque para o hexano, que é utilizado amplamente na extração de óleos vegetais. Uma desvantagem deste método é a necessidade de recuperação do solvente após a extração, o que eleva o gasto energético no processo (MUBARAK et al., 2015). Na

Figura 3 é possível observar um esquema representativo dos processos utilizados para extração de lipídios de microalgas com solventes.

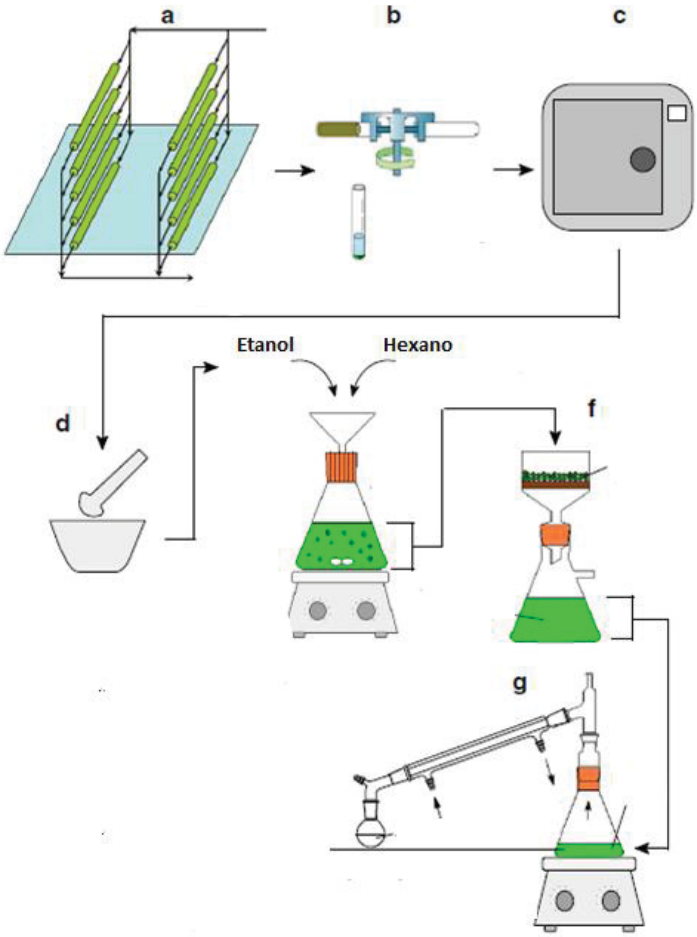


Figura 3. Representação dos processos aplicados na extração por solventes de microalgas, onde, (a) é o cultivo em fotobiorreatores, (b) concentração da biomassa por centrifugação, (c) secagem em estufa, (d) moagem, (e) mistura de solventes e biomassa, (f) filtragem do material filtrado e (g) concentração da amostra extraída através da destilação do solvente.

2.2.3 Saponificação

Este método é geralmente utilizado para separar lipídios saponificáveis dos insaponificáveis, mas pode ser aplicado diretamente na biomassa microalgal com a finalidade de recuperar os lipídios já fracionados. A reação geral da saponificação pode ser observada na Figura 4. Este método pode ser interessante para biomassas

com baixo teor lipídico e que apresentam dificuldade de extração convencional. A saponificação geralmente apresenta um bom rendimento de extração, porém gera uma grande quantidade de resíduos e a impossibilidade de recuperação da biomassa residual (OLIVEIRA, 2013; VIEGAS et al., 2015).

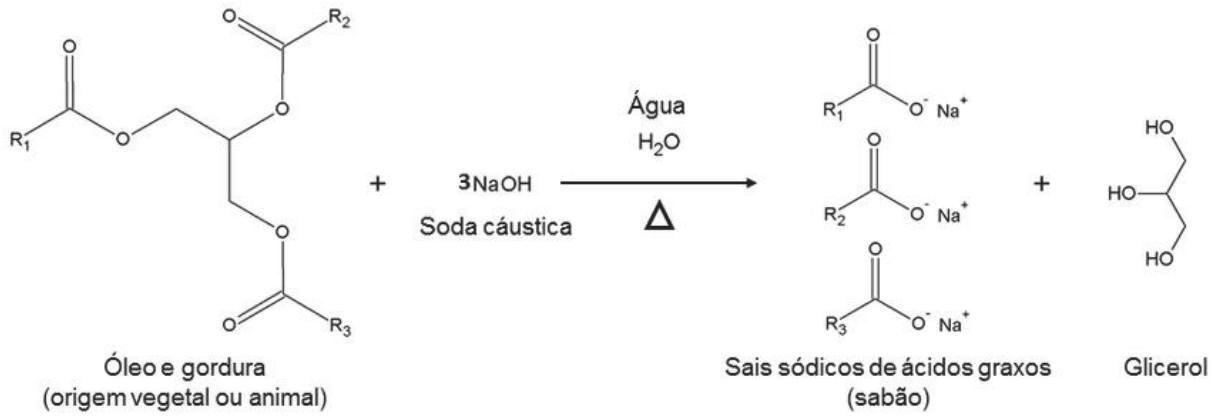


Figura 4. Reação de saponificação.

2.2.4 Prensagem

Método de extração mecânico no qual uma prensa é utilizada para romper as células e comprimir a biomassa separando o óleo, podendo extrair até 75% de material lipídico de microalgas. Para realização deste método é necessária uma grande quantidade de biomassa e costuma ser eficaz em biomassas com altos teores lipídicos (MUBARAK et al., 2015).

2.2.5 Extração por líquido pressurizado

A extração líquida pressurizada combina pressão e temperatura e um dos solventes mais utilizados é a água em seu estado subcrítico, onde ela encontra-se acima do ponto de ebulição e abaixo do ponto crítico, com a pressão controlada afim

de mantê-la em estado líquido. Este método é especialmente favorável para extração de lipídios polares e outras substâncias como carotenos e clorofila (JIMÉNEZ CALLEJÓN et al., 2022).

2.2.6 Extração por fluído supercrítico

A técnica de extração por fluídos supercríticos tem apresentado bons resultados na aplicação para extração de lipídios. Na Figura 5 podemos observar o esquema representativo deste processo de extração. O método consiste basicamente em utilizar um composto em seu estado crítico, basicamente elevando a temperatura e pressão acima do ponto crítico. Um dos solventes mais aplicados é o CO_2, devido ao seu baixo custo e fácil separação da amostra em temperatura ambiente, eliminando a necessidade de purificação e processos como o de destilação, que se faz necessário no uso de solventes líquidos (MOUAHID *et al*., 2013; TAHER *et al*., 2014; ZHOU *et al*., 2022).

Jiménez Callejón *et al*. (2022) destaca que a técnica de utilização de fluidos supercríticos e solventes pressurizados é uma tecnologia verde, pois nela pode-se aplicar o uso de solventes como etanol, e até mesmo a água, tendo a vantagem de utilização dos solventes em baixas quantidades, pois a alta temperatura aplicada aumenta a solubilidade dos analitos e no caso de solventes diminui sua viscosidade.

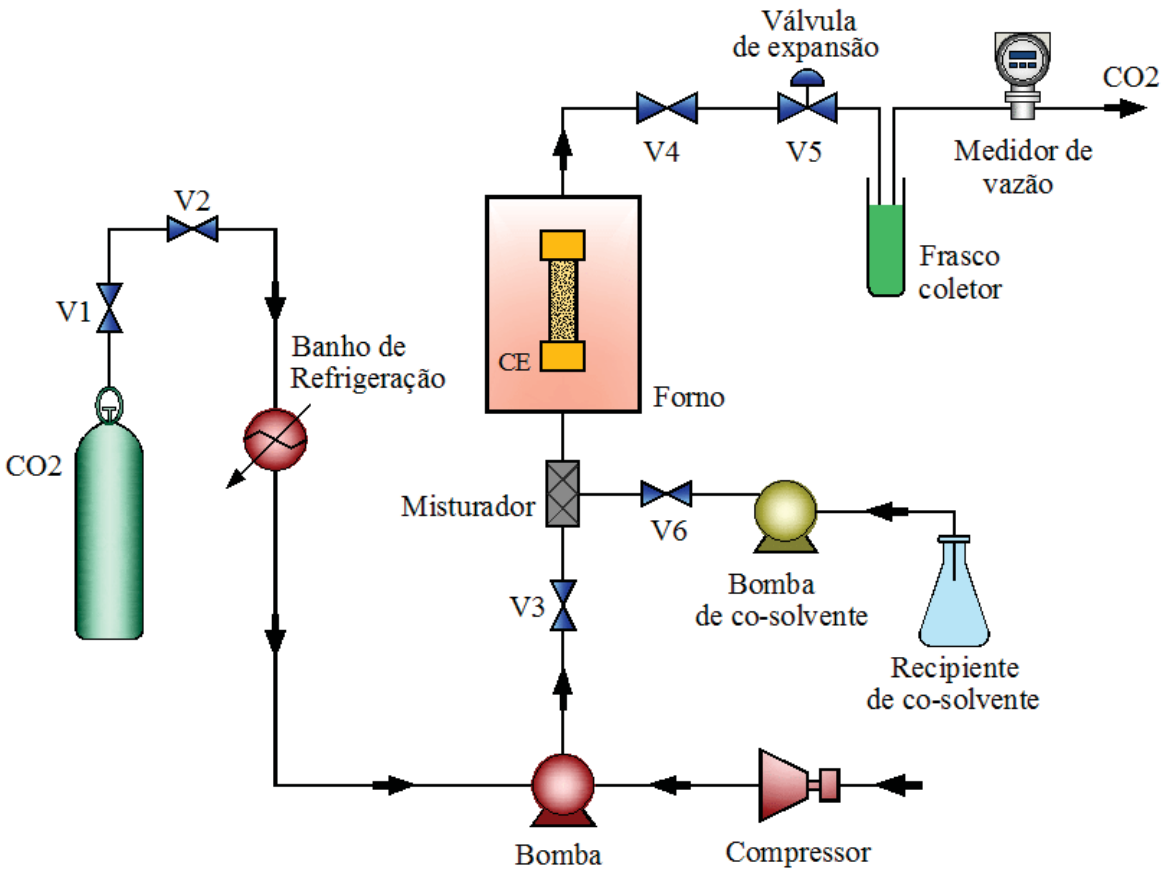


Figura 5. Esquema representativo do processo de extração por fluido supercrítico utilizando CO_2 e cossolvente.

2.3 BIODIESEL DE MICROALGAS

Para obtenção do biodiesel de microalgas, as reações de esterificação e transesterificação podem ser utilizadas para obtenção dos ésteres. A utilização destes processos depende da forma na qual o óleo se encontra, sendo a esterificação aplicada em ácidos graxos livres e a transesterificação em triacilgliceróis.

O processo de esterificação pode ser aplicado na produção de biodiesel, sendo utilizado geralmente em óleos com alto teor de acidez (grande quantidade de ácidos graxos livres) como uma etapa antes da transesterificação. Neste processo um mol de ácido graxo reage com um mol de um álcool primário (geralmente metanol e etanol), na presença de um catalisador (Figura 6). No caso das microalgas ela pode

ser empregada devido ao tipo de extração pela qual o óleo foi submetido, como fez Oliveira (2013) que obteve ácidos graxos da microalga *Scenedesmus* spp. utilizando o processo de saponificação como método de extração do óleo na forma de ácidos graxos, onde estes foram submetidos a esterificação enzimática e convertidos em mais de 96% de ésteres metílicos.

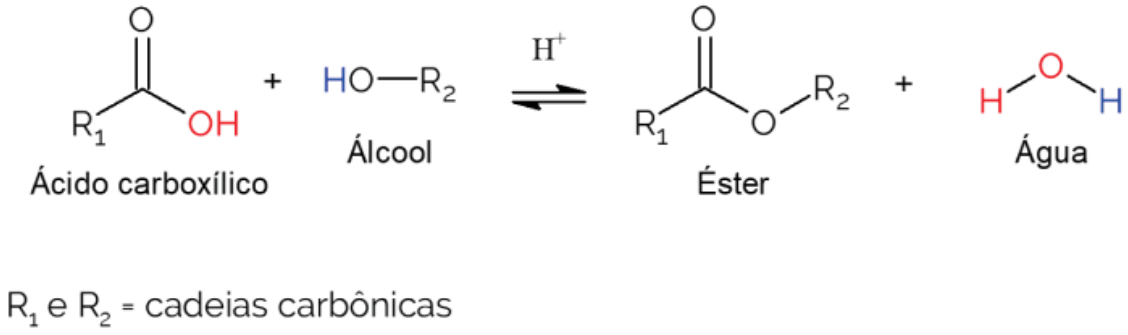


Figura 6. Reação de esterificação.

A transesterificação (Figura 7) é o processo mais empregado, e este pode ocorrer através de catálise química (homogênea ou heterogênea) ou enzimática. Neste processo, um mol de triacilglicerol reagem com 3 mols de um álcool primário, na presença de um catalisador. A catálise química homogênea, realizada com NaOH ou KOH como catalisadores é a mais comum, como a realizada por Atmanli (2020), que testou duas espécies de microalgas e comparou-as desde o processo de crescimento até a avaliação da qualidade do biodiesel obtido. Após a extração com hexano, o óleo foi primeiramente submetido a uma esterificação ácida e posterior transesterificação alcalina com metanol. A espécie de *Scenedesmus dimorphus* apresentou teor de conversão em éster de 87,4% enquanto que a de *Isochrysis aff. galbana* apresentou 94,6%.

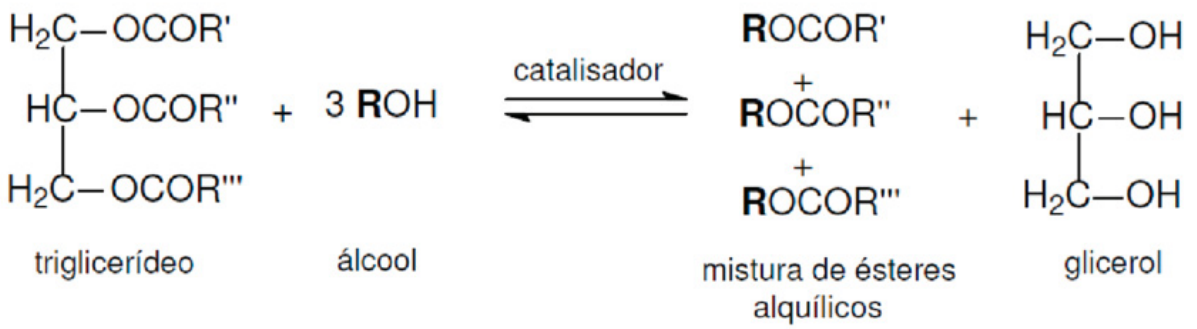


Figura 7. Reação de transesterificação.

A transesterificação heterogênea também tem sido abordada para as microalgas. Nela a diferença é que o catalisador não é miscível nos reagentes, como na catálise homogênea, sendo recuperado ao final da reação. Óxidos e enzimas são exemplos de catalisadores heterogêneos e, embora ainda não sejam aplicados em grande escala na produção de biodiesel, eles vêm sendo bastante explorados, pois apresentam vantagens como a possibilidade de reutilização no processo por sucessivas vezes, ao contrário do catalisador homogêneo que é perdido a cada reação (FERREIRA MOTA *et a*l., 2022, RAGHUVANSHI *et al*., 2018).

2.4 ANÁLISE DO CICLO DE VIDA

A análise do ciclo de vida (ACV) é conceituada como uma ferramenta para avaliação dos impactos ambientais e a saúde humana causadas por determinado processo ou produção de um material, considerando toda sua trajetória (“do berço ao tumulo”), desde a extração e processamento, transporte, aplicação, reuso e seu posterior descarte e/ou reciclagem. A ISO 14040:2009 define a ACV como: ‘*compilação e avaliação das entradas, saídas e dos impactos ambientais potenciais de um sistema de produto ao longo do seu ciclo de vida*’ (BRANCO-VIEIRA et al., 2020).

A ACV teve seus primórdios durante a primeira crise do petróleo, dos anos 60 ao início dos anos 80. A percepção de que o petróleo era uma fonte esgotável de

energia fez com que se iniciasse a busca por novos métodos de produção de energia de forma sustentável e de avaliação de processos e produtos já existentes, com a finalidade de otimizar o consumo de recursos naturais esgotáveis (SARANYA & RAMACHANDRA, 2020).

Em 1965, a empresa Coca-Cola Company financiou um estudo para avaliar a melhor embalagem do ponto de vista ambiental. O estudo foi realizado pelo *Midwest Research Institute* (MRI). Em 1974, a EPA (*Environmental Protection Agency*) realizou um estudo com o primeiro modelo do que hoje chama-se análise do ciclo de vida.

O ACV continuou sendo explorado, porém passou-se a observar que diferentes métodos de análise geravam diferentes resultados de impactos para um mesmo produto, sendo a validade da metodologia questionada, o que foi chamado de '*guerra dos ACVs'*. Então, a ISO (*International Organization for Standardization*) passa a elaborar normas e suas ferramentas que resultaram na série ISO 14000 (sendo a ISO 14040 a que normatiza o ACV).

A utilização da ACV tem diversas finalidades, como: identificar possíveis melhorias de aspectos ambientais de produtos em diversas partes do seu ciclo de vida, auxiliar na tomada de decisões no desenvolvimento de processos e produtos, auxiliar na elaboração de rótulos e declarações ambientais, e comparar produtos ou processos genéricos (LI *et al*., 2022; MEDEIROS *et al*., 2015).

Para realização da ACV, 4 etapas são aplicadas: primeiramente é necessário a definição do objetivo e escopo. Após esta definição é necessária a realização de um inventário, onde se computam todas as entradas e saídas de massa e energia, para assim poder-se realizar o cálculo dos impactos ambientais gerados por determinado processo e por fim é realizada a interpretação dos dados gerados (COLLOTTA *et al*., 2017).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi extrair, otimizar e caracterizar o óleo da microalga *Tetradesmus obliquus* e sintetizar por via enzimática o biodiesel de microalgas.

Para atingir o objetivo geral, alguns objetivos específicos foram estipulados, como:

(I) Extrair o óleo utilizando diversas metodologias;

(II) Caracterizar o óleo obtido por análises colorimétricas e cromatográficas;

(III) Realizar a síntese do biodiesel de microalgas via esterificação química;

(IV) Realizar sínteses aplicando lipases comerciais;

(V) Purificar os ésteres obtidos para elevar o teor de pureza do biodiesel obtido;

(VI) Realizar a análise do ciclo de vida dos processos utilizados;

(VII) Avaliar as características dos combustíveis obtidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Este trabalho foi desenvolvido no NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento Autossustentável). Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico e grau de pureza requeridos nos experimentos, como o palmitato de p-nitrofenila (pNPP, Sigma, PA) e ácido cis-9-octadecenóico (ácido oleico, Sigma).

4.2 BIOMASSA DE MICROALGAS

A microalga *Tetradesmus obliquus* foi isolada no NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável) localizado em Curitiba, Paraná, Brasil.

T. obliquus foi cultivada em fotobioreator compacto tubular de 12 m^3 de volume, em um regime autotrófico, utilizando resíduos biodigeridos de dejetos suínos na proporção de 2,5% (v/v) como meio de cultivo. A imagem do fotobioreator utilizado pode ser observada na Figura 8. O reator não é iluminado durante a noite, e a fonte de carbono inorgânica utilizada é o CO_2, que é comprimido e injetado a 8 m por uma coluna gasser-degasser de 0,11 m de diâmetro [0,04% (v/v)]. Após 15 dias da inoculação, 1 m^3 de meio de cultura foi colhido e a biomassa de microalgas separada por floculação utilizando um produto à base de tanino (Tanfloc SG 200 $mg.L^{-1}$, em pH de 7,5), seguido por centrifugação (3.000 rpm). A biomassa foi seca num gabinete de secagem a uma temperatura constante (60 °C) até 5-8% de umidade.

Figura 8. Fotobioreatores utilizados para produção de microalgas no NPDEAS.

4.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Tetradesmus obliquus*

4.3.1 Extração à quente com solventes orgânicos

A extração de lipídios à quente foi conduzida em frascos Erlenmeyer, e o volume de solvente empregado foi mantido para todos os experimentos, na proporção de 5 $mL.g^{-1}$ de biomassa seca. Cerca de 100 g de biomassa seca foi adicionada aos solventes: hexano, heptano, isopropanol, metanol, acetona e etanol, isoladamente, ou as misturas de: hexano-acetona, hexano-metanol, hexano-isopropanol, hexano-etanol e heptano-etanol, na proporção de 70:30 (v/v) e incubada a 60°C.

Três condições de agitação foram testadas: 2 horas sem agitação e 1 ou 3 horas de reação com agitação. Após a incubação, as amostras foram filtradas para remoção da biomassa e com posterior remoção dos solventes utilizando rotaevaporador rotativo.

4.3.2 Extração à frio com solventes orgânicos

A extração de lipídios à frio foi conduzida em frascos Erlenmeyer, e o volume de solvente empregado foi mantido para todos os experimentos na proporção de 5 $mL.g^{-1}$ de biomassa seca. Cerca de 100 g de biomassa seca foi adicionada aos solventes: hexano, heptano, isopropanol, metanol, acetona e etanol, isoladamente, ou as misturas de: hexano-acetona, hexano-metanol, hexano-isopropanol, hexano-etanol e heptano-etanol, na proporção de 70:30 (v/v) e incubada a 23°C, sem agitação, por um período de 24 horas.

Após a incubação, as amostras foram filtradas para remoção da biomassa e com posterior remoção dos solventes utilizando rotaevaporador rotativo.

4.3.3 Extração com fluído supercrítico

Esta extração foi realizada no Laboratório de Tecnologia Supercrítica da Universidade Estadual de Maringá. O equipamento utilizado foi o extrator supercrítico Teledyne Isco, modelo 500D. Cerca de 40 g de biomassa seca foram utilizadas para cada extração, sendo variadas as condições de temperatura, pressão e vazão do gás e/ou solvente de arraste. Foram testados os gases propano e dióxido de carbono, e o solvente etanol individualmente ou combinados. Cada extração foi conduzida por 1 hora.

4.3.4 Extração em meio aquoso via saponificação

Para esta extração, a biomassa seca foi acrescida de uma solução hidro alcoólica de hidróxido de sódio, nas proporções de 5 $mL.g^{-1}$ de biomassa de etanol 97%, 1 $mL.g^{-1}$ de biomassa de água e 0,5 $g.g^{-1}$ de biomassa de hidróxido de sódio. A reação foi incubada por 1 hora, a 60°C, sob agitação. Após resfriamento, o material insaponificável foi removido através de extração líquido-líquido empregando-se o solvente hexano.

Para a remoção dos ácidos graxos a fase aquosa foi submetida a hidrólise ácida com ácido cítrico para liberação dos saponificáveis. Os ácidos graxos foram removidos através de extração liquido-liquido empregando o solvente hexano. Posteriormente é realizada a remoção dos solventes utilizando rotaevaporador rotativo.

4.4 FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO OBTIDO PELOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

4.4.1 Fracionamento

Para o fracionamento de todas as amostras de lipídios obtidas, foi empregado o método de saponificação, executado do mesmo modo que o descrito no item 4.3.3, apenas utilizando o material apolar obtido das extrações no lugar da biomassa. Através deste método, é possível separar os insaponificáveis, que são compostos que não podem ser convertidos a biodiesel, como hidrocarbonetos, cetonas e álcoois do material saponificável, ou seja, os ácidos graxos capazes de passar pelo processo de esterificação.

4.4.2 Caracterização

A caracterização foi realizada para identificar os principais compostos obtidos da melhor condição de extração. Após a saponificação do material apolar obtido e separados em duas frações (saponificáveis e insaponificáveis), que foram analisadas por um Cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-2010, equipado com uma coluna (30m x 0,25mm x 0,25 µm) RTx-5MS CB (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu CGMS-QP2010.

O gás de arraste foi o hélio, num fluxo de 1,02 $mL.min^{-1}$. A rampa de aquecimento se iniciou a 60 °C por 1 minuto seguido por um aquecimento até 250°C a 3°$C.min^{-1}$. O espectrômetro de massas foi operado no modo de Impacto de Elétrons (70 eV) com a faixa de detecção entre 40 e 350 m/z. A interface e a fonte de elétrons foram a 250°C.

4.5 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS

Duas sínteses foram realizadas para obtenção do biodiesel de microalgas: a síntese por catálise enzimática e por catálise química.

O estudo da reação de síntese do biodiesel de microalgas utilizando lipases foi conduzida em frasco erlenmeyer de 125 mL, contendo um volume reacional de 10 mL. Em cada frasco foram adicionados a enzima CAL B, numa proporção equivalente a 60 U, 50 mM de ácidos graxos de microalga, 450 mM de metanol e 10 mL de hexano. As reações foram incubadas em Shaker a 50ºC e 180 rpm, e acompanhadas por 9 horas (OLIVEIRA et al., 2013)

Para a síntese química, a reação de esterificação foi realizada utilizando-se o método proposto por Hartman & Lago (1973), onde uma solução esterificante contendo ácido sulfúrico (H_2SO_4), metanol e cloreto de amônia (NH_4Cl) é acrescida aos ácidos graxos obtidos.

4.6 ANÁLISE DOS ÉSTERES OBTIDOS

4.6.1 Método de Lowry-Tinsley

Para a determinação da conversão de ácidos graxos em ésteres foi utilizado um método espectrométrico descrito por Lowry-Tinsley (1976). Este método baseia-se na ligação entre os ácidos graxos livres e os íons Cobre II em meio orgânico, possibilitando a avaliação do percentual de ácidos graxos convertidos a ésteres.

Adicionou-se 0,2 mL do meio reacional a 2,4 mL de tolueno e 0,5 mL da solução de piridina e acetato de cobre (5%). As reações foram agitadas em vórtex por 30 segundos e a fase orgânica lida em espectrofotômetro em 715 nm.

4.6.2 Cromatografia Gasosa

As soluções dos produtos das reações de esterificação (1 $mg.mL^{-1}$) foram analisadas por um Cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-2010, equipado com uma coluna (30m x 0,25mm x 0,25 µm) RTx-5MS CB (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu CGMS-QP2010. O gás de arraste foi o hélio, num fluxo de 1,02 mL min^{-1}. A rampa de aquecimento iniciou a 60°C por 1 minuto seguido por um aquecimento até 250°C a 3°C min^{-1}. O espectrômetro de massas foi operado no modo de Impacto de Elétrons (70 eV) com a faixa de detecção entre 40 e 350 m/z. A interface e a fonte de elétrons estavam a 250 °C.

4.6.3 Balanço energético

Para a realização do balanço energético foram estimadas as quantidades de energia gastas nos processos empregados.

O gasto energético dos processos foi medido com o auxílio de um amperímetro e os resultados expressos em KJ (quilojoules). A energia fornecida pelo material extraído foi calculada teoricamente pelo método de Joback (Joback e Reid, 1987), que se baseia na contribuição de grupos, obtendo através de valores tabelados os parâmetros necessários para o cálculo da entalpia de combustão de cada grupo de cada molécula.

4.7 ANÁLISE DO CICLO DE VIDA

A análise do ciclo de vida foi realizada na Universidad Tecnologica Nacional, Facultad Regional Mendoza, Mendoza – Argentina, no Grupo CLIOPE que é liderado pelo Professor Alejandro Pablo Arena.

O programa SIMAPRO foi utilizado para o cálculo dos impactos ambientais gerados, através do método Recipe.

Neste processo o sistema analisado foi o de extração e síntese do biodiesel de microalgas, por via química e via enzimática. Todas as entradas e saídas do sistema foram obtidas dos dados experimentais deste trabalho, no qual foram mensurados todos os fluxos de massa e energia no sistema.

A unidade funcional definida foi a de 1 MJ de energia gerada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS

O método de extração escolhido tem por finalidade retirar o máximo possível de material graxo presente na biomassa de microalgas. Cada espécie destes microrganismos varia quanto à quantidade e tipo de material produzido, sendo isso ligado não só a espécie escolhida, mas também a condição que esta foi cultivada.

5.1.1 Extração à quente com solventes orgânicos

Para eficaz extração do óleo de microalgas, se faz necessário o estudo de diversos processos de extração e pré-tratamento para obter a melhor condição deste material. Na Tabela 1 podemos observar os rendimentos de ácido graxo e material apolar total obtidos para a extração à quente aplicando diversos solventes puros ou misturas, bem como a agitação e tempo utilizados em busca do melhor rendimento.

A melhor condição observada para a extração de ácidos graxos da microalga *T. obliquus* foi com a mistura de etanol e hexano, aplicando agitação por um período de 3 horas. Em todas as condições de tempo e agitação, a mistura de etanol e hexano foi a melhor condição, levando em consideração o rendimento, custo e toxicidade dos solventes utilizados.

A mistura de solventes polares e apolares tem sido descrita como a melhor forma de extração do óleo de microalgas. Assim como nos resultados obtidos neste trabalho, Teo e Idris (2014) utilizaram duas diferentes espécies de microalgas, sendo observados os resultados mais promissores para extração à quente aplicando a mistura de solventes polares com apolares, sendo a mistura de Isopropanol e Hexano para a microalga *Tetraselmis* sp. e a mistura de clorofórmio e metanol para *Nannochlopsis* sp.

Tabela 1. Percentual de material apolar e de ácido graxo extraídos por solventes à quente.

SOLVENTE UTILIZADO	% MATERIAL EXTRAÍDO	% ÁCIDO GRAXO
Extração sem agitação		
Hexano	1,92 ± 0,21	0,96 ± 0,11
Heptano	1,58 ± 0,31	0,45 ± 0,08
Etanol	8,58 ± 0,98	2,84 ± 0,30
Metanol	7,14 ± 0,28	2,47 ± 0,33
Acetona	2,55 ± 0,48	0,70 ± 0,21
Isopropanol	2,00 ± 0,72	0,73 ± 0,12
Hexano + Acetona (70:30)	3,64 ± 0,63	1,62 ± 0,29
Hexano + Isopropanol (70:30)	2,12 ± 0,41	0,50 ± 0,12
Hexano + Metanol (70:30)	6,34 ± 0,44	1,59 ± 0,16
Hexano + Etanol (70:30)	5,32 ± 0,43	3,00 ± 0,55
Heptano + Etanol (70:30)	4,40 ± 0,66	2,36 ± 0,32
Extração com agitação (1 hora de reação)		
Hexano + Etanol (70:30)	11,59 ± 1,12	4,24 ± 0,56
Heptano + Etanol (70:30)	11,50 ± 0,87	4,36 ± 0,62
Extração com agitação (3 horas de reação)		
Hexano	9,98 ± 1,07	3,80 ± 0,24
Etanol	8,21 ± 0,85	3,01 ± 0,77
Hexano + Etanol (70:30)	12,79 ± 0,76	6,51 ± 0,84

5.1.2 Extração à frio com solventes orgânicos

Teste utilizando os solventes para extração à frio e sem presença de agitação também foram realizados.

Na Tabela 2 podemos observar os resultados obtidos para extração por solvente à frio, e sem agitação.

Tabela 2. Percentual de material apolar e de ácido graxo extraídos por solventes a frio.

SOLVENTE UTILIZADO	% MATERIAL EXTRAÍDO	% ÁCIDO GRAXO
Hexano	3,28 ± 0,50	0,26 ± 0,12
Heptano	1,02 ± 0,44	0,25 ± 0,09
Etanol	4,66 ± 0,45	1,11 ± 0,27
Metanol	4,10 ± 0,53	2,76 ± 0,16
Acetona	0,99 ± 0,11	0,80 ± 0,21
Isopropanol	4,41 ± 0,18	0,72 ± 0,08
Hexano + Acetona (70:30)	2,23 ± 0,26	0,81 ± 0,13
Hexano + Isopropanol (70:30)	1,71 ± 0,40	0,70 ± 0,21
Hexano + Metanol (70:30)	6,50 ± 0,16	1,53 ± 0,33
Hexano + Etanol (70:30)	5,75 ± 0,29	2,94 ± 0,13
Heptano + Etanol (70:30)	6,32 ± 1,23	1,61 ± 0,31

Como é possível observar comparando-se as duas tabelas, os resultados são bastante semelhantes. Apesar da temperatura e agitação influenciarem no rendimento final das extrações, os desempenhos frente a cada solvente foram similares. Em uma extração por solventes, todos os compostos que possuem afinidade com este solvente serão arrastados, não sendo especificamente o produto desejado, por este motivo, torna-se tão

importante a avaliação não só do material total extraído, mas sim do óleo propriamente dito.

O teor máximo de material apolar obtido foi de 6,5% para a mistura de hexano e metanol, porém o teor de ácidos graxos obtidos não foi o mais satisfatório. A mistura de etanol e hexano apresentou melhores resultados para a obtenção de ácidos graxos, sendo obtidos 2,94%.

5.1.3 Extração com fluído supercrítico

Extrações utilizando o processo de extração super critica foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Supercrítica da Universidade Estadual de Maringá.

Na Tabela 3 é possível observar as condições e resultados obtidos para a extração por fluido supercrítico.

Tabela 3. Percentual de material apolar e de ácido graxo extraídos por fluido supercrítico.

SOLVENTE E/OU GÁS UTILIZADO	TEMPERATURA (°C)	PRESSÃO (bar)	% MATERIAL EXTRAÍDO	% ÁCIDO GRAXO
Dióxido de carbono	40	180	1,82	0,15
Dióxido de carbono + Etanol (5%)	60	220	4,10	1,51
Propano	60	60	3,17	0,68
Etanol	60	150	3,83	0,80
Propano + Etanol (10%)	60	60	9,19	2,50

A melhor condição observada foi obtida com a combinação o propano com o etanol, mesmo assim, o percentual de ácidos graxos foi insatisfatório (2,5%). Solana *et al*. (2014) relatam que o seu melhor resultado foi obtido para a microalga *S. obliquus* com o fluido supercrítico CO_2 junto ao co-solvente etanol (5%), apresentando quantidades inferiores de material extraído quando aplicado apenas um fluido supercrítico.

Callejón *et al*. (2022) utilizaram a extração supercrítica com o uso de co-solventes para aumentar a capacidade de extração na biomassa de *Nannochloropsis* sp., obtendo seu melhor resultado para extração de lipídios saponificáveis quando combinados CO_2 e 10% de etanol.

Diversos métodos foram utilizados para determinar a melhor condição de extração do óleo da microalga *T. obliquus*. Na Tabela 4, podemos observar uma visão geral das melhores condições de extração, resultados obtidos e o balanço energético de cada processo.

Observando-se os melhores resultados apresentados para cada método de extração aplicando solventes, é possível comprovar a maior eficiência de extração quando uma mistura de solventes polares e apolares é aplicada, quando comparada ao uso de apenas um solvente.

Halim *et al*. (2012) descrevem em 5 etapas o processo de extração do óleo intracelular para a aplicação de apenas um solvente apolar, ou um conjunto de solventes polar e apolar. O princípio básico da extração de lipídios é de interação química entre o material lipídico e o solvente. Os lipídios são armazenados na célula na forma de gotículas aglomeradas, e com a passagem do solvente apolar pela membrana celular, forma-se um complexo lipídio-solvente mantido pela fraca interação gerada pela força de Van der Waals. Este complexo migra em relação ao gradiente de concentração, mas apenas uma pequena parte consegue atravessar a membrana celular, pois através de ligações de hidrogênio outras moléculas como carboidratos e proteínas ligam-se ao complexo lipídico, tornando difícil a passagem pela membrana.

Com o uso de co-solventes polares, como etanol e Isopropanol, o mecanismo de extração é um pouco diferente. A mistura de solventes penetra a célula e o solvente apolar interage da mesma maneira, pela força de Van der Waals, porém desta vez, quem interage com o complexo lipídio-solvente através de ligações de hidrogênio é o solvente polar utilizado, e não mais as macromoléculas intracelulares, tornando assim a travessia pela membrana celular facilitada (HALIM *et al*., 2012).

Esta interação lipídio-solvente citada anteriormente justifica os resultados obtidos para a microalga *T. obliquus*, que apresentou melhor rendimento em óleo (neste caso, avaliado como ácidos graxos esterificáveis) quando comparados à utilização de solventes puros. Uma desvantagem deste processo, é que além de extrair maior quantidade de óleo, também acaba arrastando maior quantidade de contaminantes, como hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa e pigmentos.

5.1.4 Extração em meio aquoso via saponificação

O óleo de microalgas obtido pelos métodos de extração citados apresentou alta quantidade de contaminantes, o que dificultaria o processo de síntese do biodiesel.

A solução para o fracionamento deste material foi a utilização do processo de saponificação. Através dele, todo material graxo é convertido em sais de ácidos graxos (sabões), solubilizando na fase aquosa, o que possibilita a retirada dos materiais insaponificáveis, e após acidificação do meio reacional obtemos o óleo na forma de ácidos graxos. A composição desta fração insaponificável foi caracterizada por CG-MS, para obter sua composição, e desta maneira poder calcular a energia de combustão destes compostos.

Na Tabela 4 também são apresentados os balanços energéticos dos principais processos. O processo de saponificação foi o que mais apresentou gasto energético, porém este processo é o que retira com maior eficiência o

material lipídico (ácidos graxos). Na Figura 9 é possível observar o cromatograma obtido da fração referente aos ésteres dos ácidos graxos obtidos via saponificação.

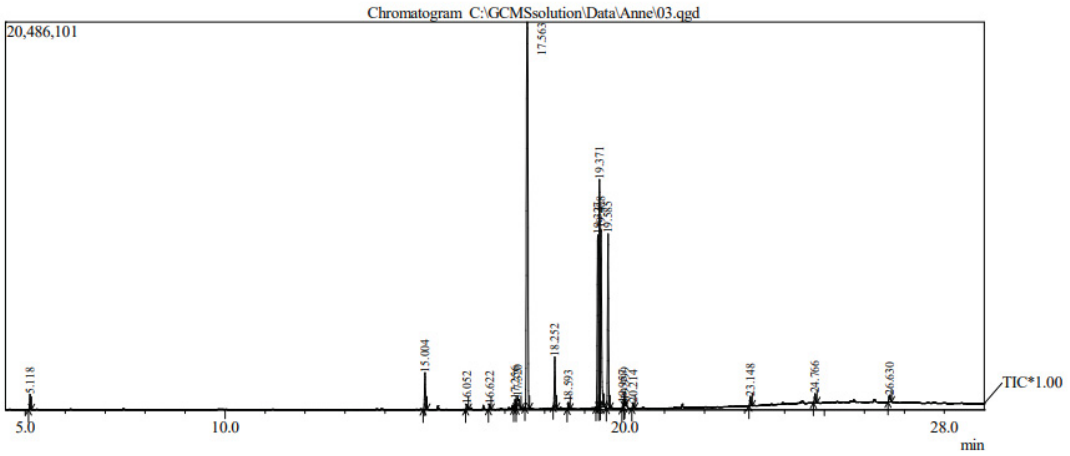


Figura 9. Cromatograma CG-MS do biodiesel de microalgas purificado em coluna de bauxita.

O processo de extração por fluido supercrítico foi o que apresentou menor rendimento em ácidos graxos, apenas 2,5%. Este é o processo de menor gasto energético, porém o alto custo do método não faz com que ele seja viável. A relação energia gasta por energia gerada foi a melhor neste processo também. Este ainda é um resultado teórico, pois, ao contrário dos ésteres de ácidos graxos, ainda não foram realizados estudos que comprovem o consumo efetivo de todo material insaponificável como combustível.

Embora este seja um resultado teórico, ele mostra-se promissor, pois o poder calorífico da amostra insaponificável foi superior a obtida pelos ésteres de ácidos graxos, o que pode tornaria mais viável a total utilização do óleo de microalgas.

Tabela 4. Comparação dos melhores resultados de cada método e balanço energético.

MÉTODO	RENDIMENTO TOTAL (%)	RENDIMENTO DE ÁCIDO GRAXO (%)	GASTO ENERGÉTICO (KJ)*	ENERGIA MATERIAL APOLAR TOTAL (KJ)**	ENERGIA ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS (KJ)***	RELAÇÃO DA ENERGIA GASTA/ ENERGIA PRODUZIDA
Extração a frio: Hexano e Etanol (70:30)	5,75	2,94	1.145,57	222,58	105,60	3,50
Saponificação	10,92	6,61	3.027,67	416,83	237,41	4,62
Extração a quente com agitação: Hexano e Etanol (70:30)	12,79	6,51	2.789,96	495,24	233,81	3,88
Extração por fluído supercrítico - Propano + Etanol (10%)	9,19	2,50	1.236,67	368,29	89,79	2,70

*Para realizar a extração a partir de 100 g de biomassa.

**Energia total gerada a partir do material apolar obtido a partir de 100 g de biomassa.

*** Energia total gerada a partir dos ésteres de ácidos graxos obtidos a partir de 100 g de biomassa.

5.2 CARACTERIZAÇÃO E FRACIONAMENTO DO ÓLEO DE MICROALGAS

O material lipídico extraídos através de todos os processos descritos no item anterior, apresentaram cor escura (verde escuro), alta viscosidade e alto teor de impurezas, o que o tornara inviável para ser submetido a produção de biodiesel, fazendo com que o fracionamento e purificação fossem necessários.

Primeiramente as amostras foram submetidas a reação de saponificação, onde os lipídios saponificáveis e insaponificáveis foram separados. Na Figura 10 é possível observar as amostras obtidas.

Figura 10. Produtos obtidos da extração da microalga *T. obliquus*, onde (A) é o óleo bruto obtido da extração por solventes, (B) é a fração de lipídios saponificáveis, (C) é a fração insaponificável e (D) são os ésteres após a reação de esterificação da fração B purificados em argila de bauxita.

A biomassa apresentou percentual de 12,8% de material bruto extraído com hexano e etanol à quente, e estas amostras após a saponificação apresentaram as duas frações (saponificável e insaponificável) praticamente na mesma proporção.

Mesmo com o fracionamento do óleo, as amostras apresentaram coloração escura e alta viscosidade. A amostra da fração saponificável (ácidos graxos) foi esterificada, e após purificação em bauxita foi submetida a análise cromatográfica em cromatógrafo gasoso com detector de massa acoplado com a finalidade de identificar os principais ácidos graxos presentes na amostra. O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 9.

Para produção de biodiesel é necessário avaliar não só a quantidade de material lipídico produzido pela biomassa, mas também a qualidade do perfil lipídico da amostra (VIDYASHANKAR *et al.*, 2015). A partir do cromatograma (Apêndice 1) é possível observar a predominância do ácido graxo C16 palmítico, e dos ácidos graxos C18 oleico, linoleico, linolênico e esteárico.

A fração de insaponificáveis também foi investigada, e na Figura 11 é possível observar o cromatograma obtido por cromatografia gasosa com detector de massa (CG-MS). Esta fração apresentou aspecto bastante viscoso e coloração alaranjada forte.

No cromatograma foi possível detectar hidrocarbonetos de cadeia longa, como o heptadecano (cerca de 30% de área do cromatograma), mas também em menor quantidade estava presente o octadecano, e um composto naftênico. Além da presença de hidrocarbonetos, uma presença massiva de álcoois de cadeia longa foi observada, com predomínio do hexadecenol. Estes álcoois estão ligados a produção de clorofila e outros pigmentos pelas células das microalgas.

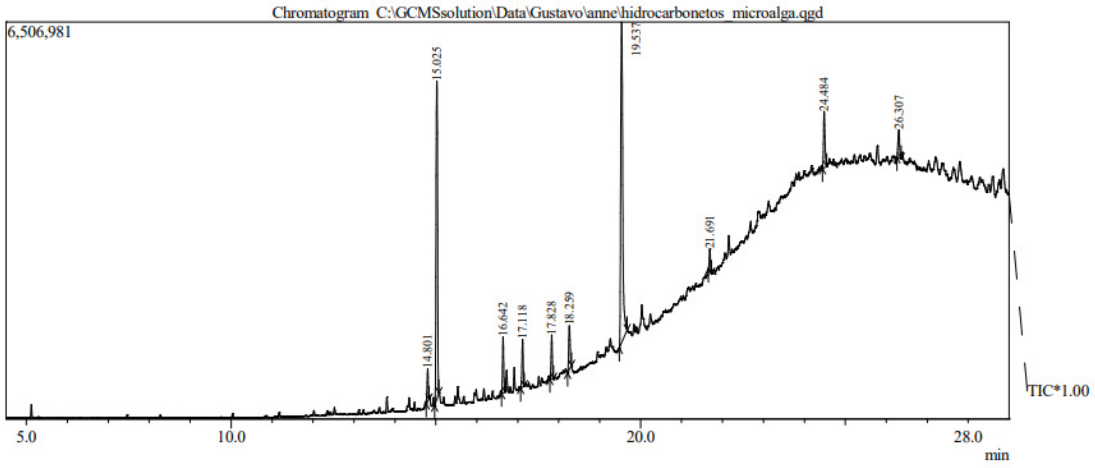


Figura 11. Cromatograma CG-MS da fração de lipídios insaponificáveis da microalga *T. obliquus*.

A presença destes compostos apolares no material graxo da biomassa é de grande interesse, pois são compostos de interesse energético. Hidrocarbonetos são extensivamente usados para adição no diesel e como combustível de aviação (FU *et al*., 2015). Trabalhos como os de Priharto *et al*. (2020) utilizam biomassa de uma espécie de *Scenedsmus sp*. para obtenção de hidrocarbonetos pelo processo de pirólise. Neste processo a biomassa é submetida a uma alta temperatura com ausência de oxigênio para formação do bio-óleo, que continha hidrocarbonetos como o hexadecano (CHOO *et al*., 2017; HUANG *et al*., 2022).

Neste trabalho observamos que a própria microalga metabolicamente produz o hidrocarboneto, sem necessidade de pós-tratamento, como o da pirólise no caso, apenas é necessária a separação do material lipídico obtido da biomassa.

Dayananda (2007) avaliou vários meios de cultivo com a finalidade de obter hidrocarbonetos de microalgas. Os autores não especificam os hidrocarbonetos obtidos, apenas os caracterizaram por tamanho de cadeia em C>30 e C<30, e afirmam ter obtido em sua melhor condição de cultivo 46% de hidrocarbonetos em relação a biomassa seca.

Vidyashankar (2015) analisou a composição de ácidos graxos e hidrocarbonetos de 6 espécies de microalgas, sendo que 3 destas

apresentaram destaque para produção de hidrocarbonetos, produzindo acima de 10% em peso de biomassa seca. Todas as microalgas apresentaram predominância de alcanos compreendidos entre C15 e C20, assim como observado neste trabalho. Outro ponto semelhante obtido neste trabalho e no dos autores é que grande parte do material apolar obtido também era composto por cadeias isoprênicas, substâncias que participam da biossíntese de compostos observados nas microalgas.

5.3 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E QUÍMICA DO ÓLEO DE MICROALGAS

Dois processos foram utilizados para a produção do biodiesel de microalgas: a esterificação química e a esterificação enzimática com a lipase CAL B.

A esterificação enzimática foi acompanhada por 9 horas pelo método colorimétrico de Lowry-Tinsley, para verificação da formação de ésteres ao longo do tempo. Nesta etapa a conversão máxima em ésteres observada foi a de 91,3%. Este valor calcula o teor de ácido graxo que foi convertido em éster e não a pureza. Após purificação em coluna de bauxita, a amostra foi concentrada e submetida a cromatografia gasosa. O laudo pode ser observado no Apêndice 3, onde o teor de éster máximo foi de 79%.

Oliveira *et al.* (2012), realizaram a esterificação enzimática do ácido oleico puro. Neste caso, o produto original já era purificado, e não necessitava de um processamento posterior para obtenção do éster puro.

Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2017) buscaram reduzir o tempo de operação da transesterificação direta catalisada por lipase. Vários parâmetros operacionais foram estudados, tais como relação solvente/alga, adição de catalisador, adição de água, temperatura e tempo de reação da transesterificação direta de *Botryococcus sp*. com e sem ultrassom. O máximo rendimento foi obtido com 4 horas de tratamento com ultrassom, sob condições ótimas, obtendo 88% de ésteres metílicos. Os autores não descrevem nenhum processo de purificação posterior a reação de síntese neste trabalho.

A reação de esterificação química foi realizada e diretamente submetida a purificação em coluna de bauxita. Esta amostra também foi submetida a cromatografia gasosa, obtendo um teor total de ésteres de 88,7%.

5.4 ANÁLISE DO CICLO DE VIDA

Para realização da análise do ciclo de vida (ACV) todos os processos experimentais realizados neste trabalho foram analisados, sendo 3 diferentes métodos de extração (a frio, a quente e saponificação direta) em suas melhores condições, e, 2 métodos de esterificação do ácido graxo (via catalise química e enzimática). No fluxograma abaixo (Figura 12) é possível observar as etapas de cada processo.

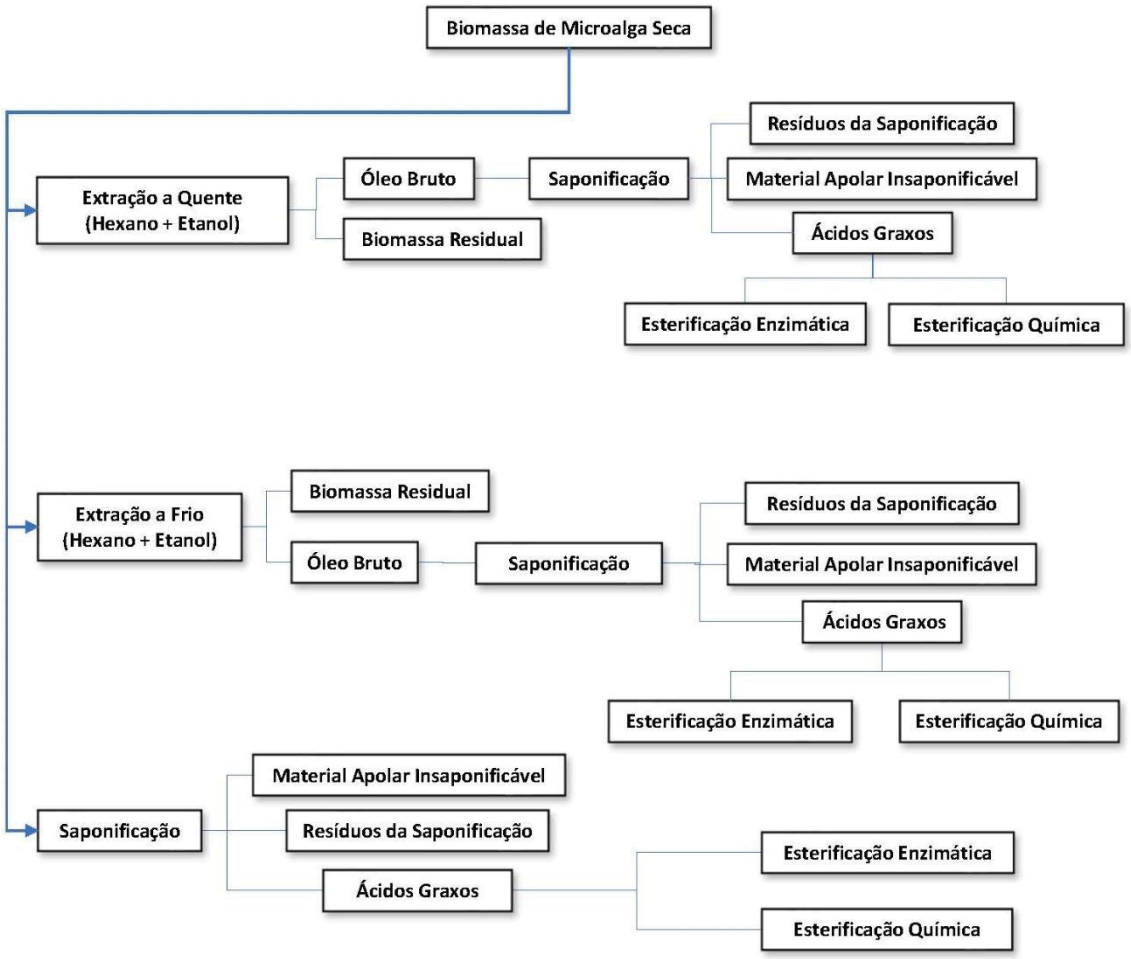


Figura 12. Fluxograma de todos os processos experimentais avaliados através da Análise do Ciclo de Vida.

Como unidade funcional (UF) foi utilizado 1 MJ de energia gerada pelo biodiesel produzido, o que equivale a 32,1 g de biodiesel de microalgas. A energia fornecida pelo biodiesel de microalgas foi calculada teoricamente pelo método de Joback (Joback e Reid, 1987), que se baseia na contribuição de grupos, obtendo através de valores tabelados os parâmetros necessários para o cálculo da entalpia de combustão de cada grupo de cada molécula.

Na Tabela 5 é possível observar os impactos gerados pelos 6 processos analisados em 18 categorias de impacto. Dos impactos avaliados, 8 destacam-se como categorias que mais foram impactadas pelos processos analisados, sendo eles: ocupação de terras agrícolas, depleção de água, depleção de metais, depleção de combustíveis fosseis, alterações climáticas, toxicidade humana, formação de oxidantes fotoquímicos e radiação ionizante.

De um modo geral, como pode ser observado na Tabela 5, a extração a quente quando comparada a extração a frio gerou impactos muito semelhantes em todas as categorias analisadas. Ambos os processos de extração têm os mesmos procedimentos gerais, exceto pelo menor tempo de reação na extração à quente e a ausência de consumo de energia para aquecimento e agitação no processo a frio. Devido a não necessidade de utilizar a energia para aquecimento e agitação do meio reacional, era de se esperar um impacto reduzido neste processo, o que não ocorreu. Este fato pode ser justificado pela eficiência do processo de extração de cada método.

Durante o processo à quente, cerca de 6,5% de ácidos graxos são retirados da biomassa, enquanto que no processo à frio apenas 2,9%, ou seja, para obter a mesma quantidade de material extraído é necessária a realização da extração de mais que o dobro da biomassa utilizada no processo à quente, utilizando assim o dobro de reagentes e gerando o dobro de resíduos, fato que acaba por aumentar os impactos gerados como um todo e tornando mais atrativo o processo de extração à quente pela maior eficiência.

O terceiro método de extração avaliado foi o de saponificação. Este método extrai de maneira fracionada o ácido graxo e o material apolar, o que dispensa o fracionamento posterior a extração, reduzindo o processo em uma etapa. Este processo apresenta a vantagem de ter uma etapa a menos de

fracionamento e de extrair ao máximo os compostos de interesse, porém é o método que gera maior impacto ambiental.

Como pode ser observado na Figura 13, os dois processos que apresentam maiores valores em todas as categorias de impacto são os que utilizaram a saponificação como método de extração de óleo da biomassa de microalgas.

O principal gargalo deste processo é a geração de resíduos significativamente maior que nos outros dois processos de extração. Na saponificação a biomassa é completamente inutilizada, pois o meio reacional passa por uma etapa hidroalcóolica contendo uma base forte (NaOH), com posterior acidificação do meio, o que resulta na alteração de compostos da biomassa residual, impossibilitando seu uso.

Outro ponto é o volume de resíduo gerado no processo. Além da biomassa, todo o meio reacional vira resíduo, sem possibilidade de reutilização dos reagentes, enquanto, nos processos de extração utilizando solventes, estes podem ser recuperados e reutilizados em sucessivas extrações, além de não danificar a biomassa residual que pode ser utilizada para diferentes destinos, como o emprego em ração animal.

Todas as categorias de impacto avaliadas apresentaram elevação nos valores na extração realizada via saponificação, sendo as categorias ocupação de terras agrícolas e depleção de água as mais elevadas. A categoria ocupação de terras agrícolas apresentou valores aproximadamente 10 vezes maior do que os obtidos na extração com solventes, enquanto a categoria de depleção de água foi 6 vezes maior.

A grande elevação da área agrícola ocupada pode ser explicada pelo grande volume de resíduo. Esta categoria avalia a área ocupada/transformada por um período de tempo. O alto volume de resíduo leva a ocupação de área para tratamento, uma vez que as emissões consideradas nos processos de extração por solventes liberam nesta etapa apenas emissões ao ar, o que justifica o valor tão elevado do processo de saponificação em relação a estes.

A categoria depleção a água apresentou valor 6 vezes maior para o processo de extração via saponificação quando comparada a extração com solventes. Mais uma vez os resíduos gerados no processo são os grandes responsáveis por este resultado, pois o tratamento adequado aos resíduos da saponificação faz uso de água no processo de neutralização dos reagentes utilizados bem como da biodegradação da matéria orgânica residual proveniente da biomassa inutilizada após o processo de extração.

Além dos métodos de extração, também foram comparados integradamente os processos de esterificação para obtenção do biodiesel, que foram os de catálise via química e enzimática.

No processo de esterificação enzimática a enzima industrial CAL-B foi utilizada, enquanto que no processo de esterificação química foi realizada utilizando ácido sulfúrico como catalisador. Todas as categorias de impacto avaliadas quando comparadas entre o mesmo processo de extração para os dois tipos de catalise apresentaram resultados iguais ou ligeiramente maiores para a catalise enzimática. A catálise enzimática exige um maior período de reação, o que leva a um consumo energético um pouco maior, além de possuir um meio reacional mais volumoso do que o da catalise química, levando a uma maior emissão de solventes ao ar e consequentemente mais energia é necessária para a recuperação de um maior volume de solventes.

Saranya & Ramachandra (2020) compararam o processo de transesterificação utilizando catálise química e enzimática para síntese do biodiesel de microalgas e notaram diminuição significativa nas emissões gasosas quando utilizados os biocatalisadores no lugar do catalisador ácido, resultado divergente ao obtido neste estudo. Este fato pode ser explicado pelo fato de os autores terem utilizado lipases fúngicas produzidas em pequena escala no laboratório, ao contrário deste trabalho, que utilizou lipases comerciais, o que computa diferentes níveis de emissão.

Tabela 5. Impacto gerado pelos métodos de extração e esterificação avaliados experimentalmente.

Categoria de impacto	Unidade	Biodiesel enzimático de microalgas (Extração a Quente)	Biodiesel enzimático de microalgas (Extração a Frio)	Biodiesel enzimático de microalgas (Saponificação Direta)	Biodiesel químico de microalgas (Extração a Quente)	Biodiesel químico de microalgas (Extração a Frio)	Biodiesel químico de microalgas (Saponificação Direta)
Alterações Climáticas	kg CO_2 eq	1,88	1,83	3,47	1,51	1,46	3,09
Depleção da camada de Ozônio	kg CFC^{-11} eq	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acidificação Terrestre	kg SO_2 eq	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,03
Eutrofização de água doce	kg P eq	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eutrofização marinha	kg N eq	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
Toxicidade humana	kg 1,4-DB eq	0,93	0,91	2,28	0,71	0,69	2,06
Formação de oxidantes fotoquímicos	kg NMVOC	0,21	0,21	0,48	0,15	0,14	0,42
Formação de Partículas	kg PM10 eq	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
Ecotoxicidade terrestre	kg 1,4-DB eq	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06
Ecotoxicidade de água doce	kg 1,4-DB eq	0,04	0,04	0,09	0,03	0,03	0,08
Ecotoxicidade marinha	kg 1,4-DB eq	0,04	0,04	0,08	0,03	0,03	0,07
Radiação Ionizante	kBq U235 eq	0,33	0,33	0,57	0,25	0,24	0,48
Ocupação de terras agrícolas	m^2a	0,23	0,20	1,94	0,19	0,16	1,91
Ocupação de solo urbano	m^2a	0,05	0,05	0,07	0,04	0,04	0,07
Mudança no uso da terra	m^2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Depleção de água	m^3	0,06	0,05	0,31	0,05	0,04	0,30
Depleção de metal	kg Fe eq	0,16	0,15	0,30	0,13	0,12	0,27
Depleção de combustíveis fósseis	kg oil eq	1,38	1,37	1,85	0,99	0,98	1,45

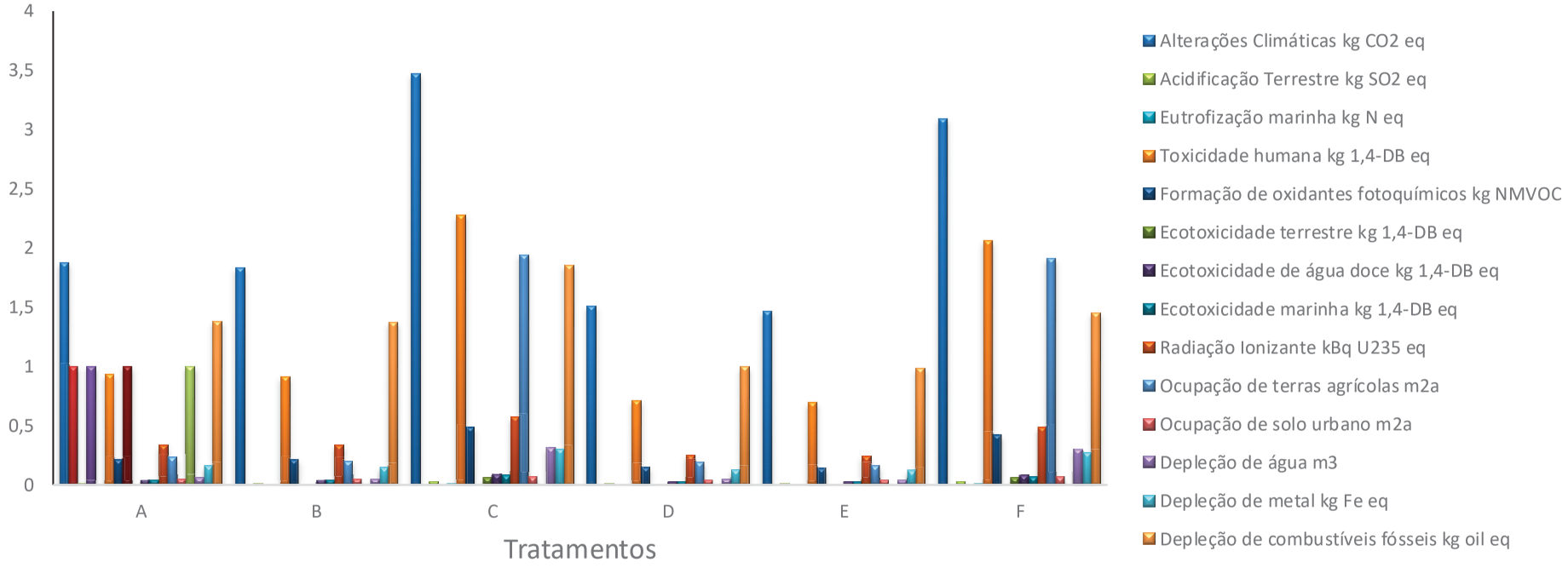


Figura 13. Comparação do impacto gerado pelos métodos de extração e esterificação avaliados experimentalmente, sendo: (A) Biodiesel enzimático de microalgas (Extração a Quente), (B) Biodiesel enzimático de microalgas (Extração a Frio), (C) Biodiesel enzimático de microalgas (Saponificação Direta), (D) Biodiesel químico de microalgas (Extração a Quente), (E) Biodiesel químico de microalgas (Extração a Frio), (F) Biodiesel químico de microalgas (Saponificação Direta).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho podemos concluir que a microalga *Tetradesmus obliquus* pode ser uma possível fonte de material lipídico para produção de biocombustíveis.

Embora a microalga apresente uma quantidade relativamente baixa de material lipídico (cerca de 10% no total), este material apresenta características interessantes para aplicação em biocombustíveis, como no caso da parte oleosa, que apresenta ácidos graxos de cadeias similares as encontradas em plantas oleaginosas comumente usadas para produção de biodiesel.

Outro ponto de destaque para este material lipídico é a obtenção de compostos apolares de natureza hidrocarbônica, pois hidrocarbonetos de cadeias longas foram encontrados na amostra insaponificável do material graxo obtido, podendo estes serem aplicados na produção de querosene de aviação.

Trabalhos futuros aplicando métodos como o de destilação fracionada devem ser realizados com a finalidade de desenvolver querosene de aviação obtida da biomassa de *Tetradesmus obliquus*.

Tanto a catálise química quanto a enzimática mostraram-se viáveis para a esterificação do óleo de microalgas, apresentando resultados satisfatórios no nível de conversão dos ácidos graxos presentes em ésteres metílicos. A conversão ~~em si~~ foi satisfatória, porém a purificação do biodiesel de microalgas foi uma parte complexa, uma vez que uma série de outros compostos (como pigmentos e os hidrocarbonetos) estavam presentes no material obtido.

Este trabalho obteve nível máximo de ésteres metílicos de microalga perto dos 83%, o que ainda não configura o material obtido como biodiesel. Novos processos de purificação do óleo e do material esterificado devem ser investigados.

A análise do ciclo de vida foi aplicada para avaliar os impactos ambientais gerados pelos processos de extração e esterificação utilizados neste trabalho. O processo de extração por saponificação foi o que apresentou maiores níveis em todas as categorias de impacto ambiental avaliadas. Este processo foi o mais efetivo em termos de extração do material, porém os altos volumes de meio reacional e

resíduos gerados no processo fizeram com que o método fosse considerado o mais agressivo ambientalmente.

Para trabalhos futuros sugerimos a otimização dos métodos de extração, de modo a obter melhor quantidade de material obtido e também de reduzir os impactos gerados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATMANLI, A. Experimental comparison of biodiesel production performance of two different microalgae. **Fuel** v. 278, p. 118311, 2020.

BRANCO-VIEIRA, M.; COSTA, D.; MATA, T. M.; et al. A life cycle inventory of microalgae-based biofuels production in an industrial plant concept. **Energy Reports**. v. 6, p.397–402, 2020.

CHHANDAMA, M. V. L.; SATYAN, K. B.; CHANGMAI, B.; VANLALVENI, C.; ROKHUM, S. L. Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, p. 100771, 2021.

CHOO, M. Y.; OI, L. E.; SHOW, P. L.; et al. Recent progress in catalytic conversion of microalgae oil to green hydrocarbon: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 116–124, 2017.

COLLOTTA, M.; BUSI, L.; CHAMPAGNE, P.; et al. Comparative LCA of Three Alternative Technologies for Lipid Extraction in Biodiesel from Microalgae Production. **Energy Procedia**. v. 113, p.244–250, 2017.

COLLOTTA, M.; CHAMPAGNE, P.; MABEE, W.; et al. Comparative LCA of Flocculation for the Harvesting of Microalgae for Biofuels Production. **Procedia CIRP**. v. 61, p.756–760, 2017.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; USHA RANI, M.; SHAMALA, T. R.; RAVISHANKAR, G. A. Autotrophic cultivation of Botryococcus braunii for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 1, p. 87–93, 2007.

FARIED, M.; SAMER, M.; ABDELSALAM, E.; et al. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 893-913, 2017.

FERREIRA MOTA, G.; GERMANO DE SOUSA, I.; LUIZ BARROS DE OLIVEIRA, A.; et al. Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. **Algal Research**, v. 62, p. 102616, 2022.

FLORENTINO DE SOUZA SILVA, A. P.; COSTA, M. C.; COLZI LOPES, A.; et al. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. **Renewable Energy**, v. 63, p. 762–766, 2014.

FU, J.; YANG, C.; WU, J.; et al. Direct production of aviation fuels from microalgae lipids in water. **Fuel**, v. 139, p. 678–683, 2015.

GAO, C.; ZHAI, Y.; DING, Y.; WU, Q. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga Chlorella protothecoides. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 756–761, 2010.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.

HUANG, Z.; ZHANG, J.; PAN, M.; et al. Valorisation of microalgae residues after lipid extraction: Pyrolysis characteristics for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 179, 2022.

JIMÉNEZ CALLEJÓN, M. J.; ROBLES MEDINA, A.; MACÍAS SÁNCHEZ, M. D.; et al. Supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction processes applied to eicosapentaenoic acid-rich polar lipid recovery from the microalga Nannochloropsis sp. **Algal Research**, v. 61, p. 102586, 2022.

JOBACK, K.G.; REID, R.C. Estimation of Pure-Component Properties from Group-Contributions. **Chemical Engineering Communications**, v. 57, p. 233–243, 1987.

LEESING, R.; SIHAWONG, S.; DUANGKEAW, N. Producing of Microalgal Lipid by Isolated Microalgae under Photoautotrophic and Heterotrophic Cultivations. **APCBEE Procedia**, v. 7, p. 48–53, 2013.

LI, G.; HU, R.; WANG, N.; et al. Cultivation of microalgae in adjusted wastewater to enhance biofuel production and reduce environmental impact: Pyrolysis performances and life cycle assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 355, 2022.

LOWRY, R.R.; TINSLEY.; J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids**. Journal American Oil Chemical Society,** v. 53, p. 470-472, 1976.

MEDEIROS, D. L.; SALES, E. A.; KIPERSTOK, A. Energy production from microalgae biomass: Carbon footprint and energy balance. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 493–500, 2015.

MOUAHID, A.; CRAMPON, C.; TOUDJI, S. A. A.; BADENS, E. Supercritical CO2 extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 77, p. 7–16, 2013.

MUBARAK, 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.

NAVARRO LÓPEZ, E.; ROBLES MEDINA, A.; GONZÁLEZ MORENO, P. A.; ESTEBAN CERDÁN, L.; MOLINA GRIMA, E. Extraction of microalgal lipids and the influence of polar lipids on biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 904–913, 2016.

OLIVEIRA, A.C.D. **Síntese enzimática do biodiesel de microalgas a partir de lipases produzidas por fungos endofíticos**. Dissertação de mestrado. Curitiba. UFPR. 2013

OLIVEIRA, A.C.D., WATANABE, F.M.F., VARGAS, J.V.C., RODRIGUES, M.L.F., MARIANO, A.B. Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 295– 300, 2012.

PRIHARTO, N.; RONSSE, F.; PRINS, W.; CARLEER, R.; HEERES, H. J. Experimental studies on a two-step fast pyrolysis-catalytic hydrotreatment process for hydrocarbons from microalgae (Nannochloropsis gaditana and Scenedesmus almeriensis). **Fuel Processing Technology**, v. 206, p. 106466, 2020.

RAGHUVANSHI, S.; BHAKAR, V.; CHAVA, R.; SANGWAN, K. S. Comparative Study Using Life Cycle Approach for the Biodiesel Production from Microalgae Grown in Wastewater and Fresh Water. **Procedia CIRP. Anais**. v. 69, p.568–572, 2018.

RAVANIPOUR, M.; HAMIDI, A.; MAHVI, A. H. Microalgae biodiesel: A systematic review in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v, 150, p. 111426, 2021.

REHMAN, M.; KESHARVANI, S.; DWIVEDI, G.; GIDWANI SUNEJA, K. Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. **Materials Today: Proceedings**, v. 56, p. 282–290, 2022

DEL RÍO, E.; ARMENDÁRIZ, A.; GARCÍA-GÓMEZ, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 103–107, 2015.

SARANYA, G.; RAMACHANDRA, T. V. Life cycle assessment of biodiesel from estuarine microalgae. **Energy Conversion and Management: X**, v. 8, p. 100065, 2020.

SCHÜLER, L. M.; SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H.; et al. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. **Algal Research**, v. 25, p. 263-273, 2017.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Direct transesterification of Botryococcus sp. catalysed by immobilized lipase: Ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester. **Fuel**, v. 191, p. 363–370, 2017.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between Scenedesmus obliquus, Chlorella protothecoides and Nannochloropsis salina. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 311–318, 2014.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M.; et al. Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 57–66, 2014.

TEO, C. L.; IDRIS, A. Enhancing the various solvent extraction method via microwave irradiation for extraction of lipids from marine microalgae in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 477–481, 2014.

VIDYASHANKAR, S.; VENUGOPAL, K. S.; SWARNALATHA, G. V.; et al. Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source. **Biomass and Bioenergy**, v. 77, p. 75–91, 2015.

VIEGAS, C. V.; HACHEMI, I.; MÄKI-ARVELA, P.; et al. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga Chlorella sp. **Algal Research**, v. 11, p. 156–164, 2015.

WU, S.; SONG, L.; SOMMERFELD, M.; HU, Q.; CHEN, W. Optimization of an effective method for the conversion of crude algal lipids into biodiesel. **Fuel**, v. 197, p. 467–473, 2017.

ZHANG, P.; FENG, L.; SU, B.; LI, X. Microalgae cultivated in wastewater catalytic hydrothermal liquefaction: Effects of process parameter on products and energy balance. **Journal of Cleaner Production**, v. 341, p. 130895, 2022.

ZHOU, J.; WANG, M.; SARAIVA, J. A.; et al. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132236, 2022.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Cromatograma CG-MS de biodiesel de microalgas purificado em coluna de bauxita com tempos de retenção 62

Apêndice 2. Cromatograma CG-MS da fração de lipídios insaponificáveis da microalga *T. obliquus* e tempos de retenção 63

Apêndice 3. Laudo emitido pelo LACAUT (Laboratório de análise de combustíveis automotivos) com a porcentagem de ésteres nas amostras de biodiesel obtido via catálise química (amostra 2) e enzimática (amostra 3) 64

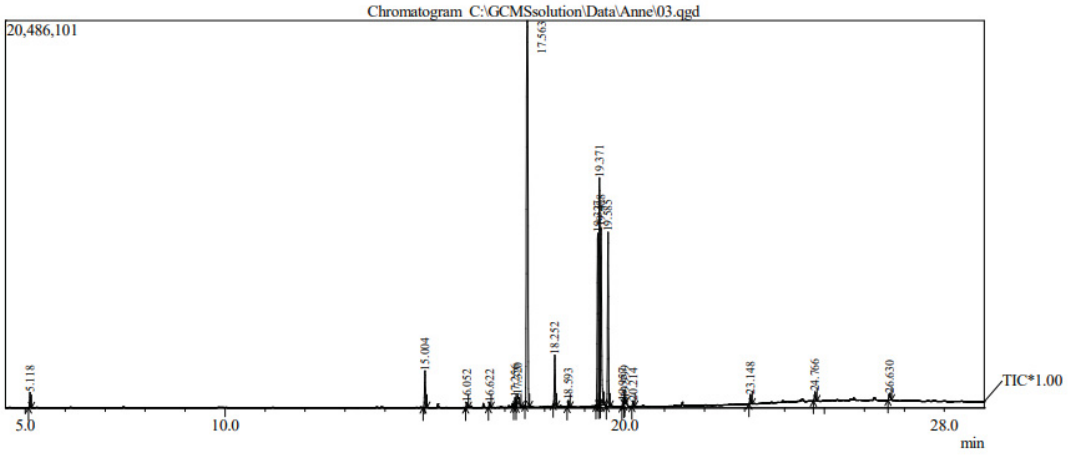
APÊNDICE 1

Sample Information

Analyzed by	: Vinicius
Analyzed	: 16/5/2014 12:14:25
Sample Type	: Unknown
Level #	: 1
Sample Name	:
Sample ID	:
IS Amount	: [1]=1
Sample Amount	: 1
Dilution Factor	: 1
Vial #	: 3
Injection Volume	: 1
Data File	: C:\GCMSsolution\Data\Anne\03.qgd
Org Data File	: C:\GCMSsolution\Data\Anne\03.qgd
Method File	: C:\GCMSsolution\Data\60-300 (10oCmin).qgm
Org Method File	: C:\GCMSsolution\Data\60-300 (10oCmin).qgm
Report File	:
Tuning File	: C:\GCMSsolution\System\Tune1\040613.qgt
Modified by	: Vinicius
Modified	: 16/5/2014 12:43:26

Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%
1	5.118	1123449	0.77
2	15.004	3186954	2.19
3	16.052	416399	0.29
4	16.622	468779	0.32
5	17.256	795369	0.55
6	17.320	2220368	1.52
7	17.563	52759695	36.18
8	18.252	4223680	2.90
9	18.593	584676	0.40
10	19.327	16734706	11.48
11	19.371	25579167	17.54
12	19.408	17306293	11.87
13	19.585	16215278	11.12
14	19.957	468583	0.32
15	19.999	441429	0.30
16	20.214	528883	0.36
17	23.148	917696	0.63
18	24.766	990746	0.68
19	26.630	873474	0.60
		145835624	100.00



Apêndice 1. Cromatograma CG-MS de biodiesel de microalgas purificado em coluna de bauxita com tempos de retenção.

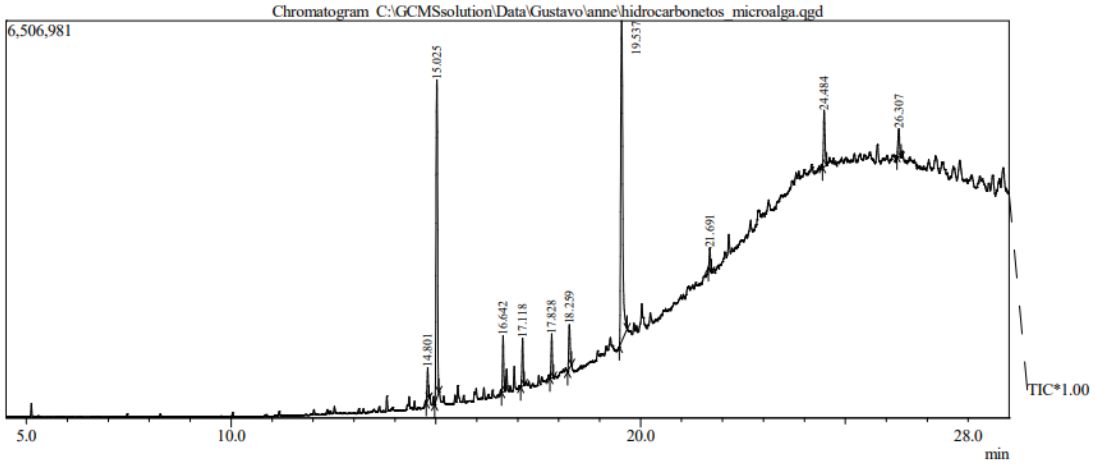
APÊNDICE 2

Sample Information

Analyzed by	: Vinicius
Analyzed	: 10/9/2014 13:54:22
Sample Type	: Unknown
Level #	: 1
Sample Name	:
Sample ID	:
IS Amount	: [1]=1
Sample Amount	: 1
Dilution Factor	: 1
Vial #	: 2
Injection Volume	: 1
Data File	: C:\GCMSsolution\Data\Gustavo\anne\hidrocarbo
Org Data File	: C:\GCMSsolution\Data\Gustavo\anne\hidrocarbo
Method File	: C:\GCMSsolution\Data\60-300 (10oCmin).qgm
Org Method File	: C:\GCMSsolution\Data\60-300 (10oCmin).qgm
Report File	:
Tuning File	: C:\GCMSsolution\System\Tune1\040613.qgt
Modified by	: Vinicius
Modified	: 10/9/2014 14:23:22

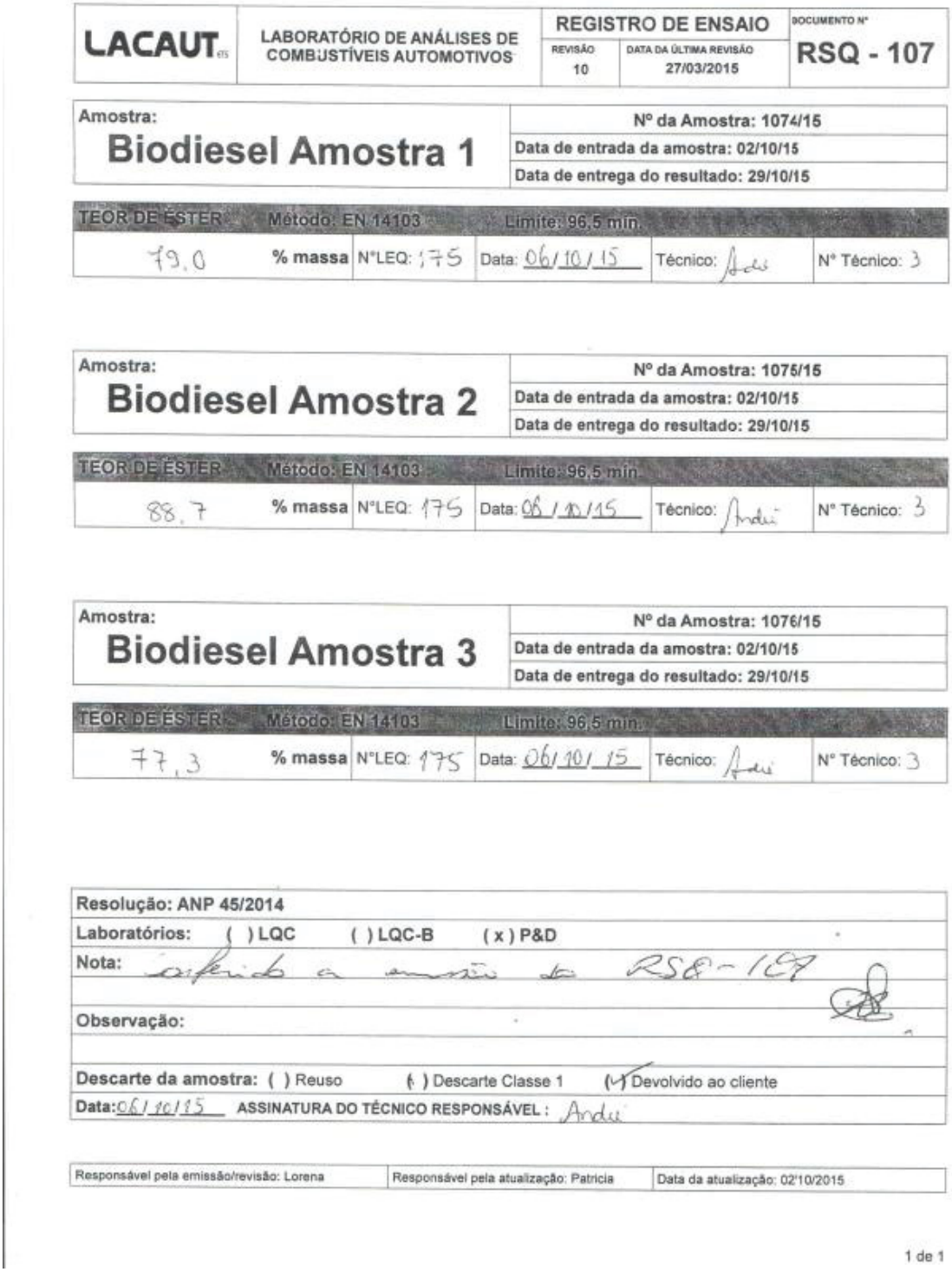
Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%
1	14.801	1000400	2.35
2	15.025	13127228	30.87
3	16.642	1763013	4.15
4	17.118	1575349	3.70
5	17.828	1388700	3.27
6	18.259	1712771	4.03
7	19.537	17554348	41.28
8	21.691	753191	1.77
9	24.484	2379786	5.60
10	26.307	1274482	3.00
		42529268	100.00



Apêndice 2. Cromatograma CG-MS da fração de lipídios insaponificáveis da microalga *T. obliquus* e tempos de retenção.

APÊNDICE 3



LACAUT ETS	LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE COMBUSTÍVEIS AUTOMOTIVOS	REGISTRO DE ENSAIO		DOCUMENTO Nº
		REVISÃO 10	DATA DA ÚLTIMA REVISÃO 27/03/2015	RSQ - 107

Amostra: Biodiesel Amostra 1	Nº da Amostra: 1074/15
	Data de entrada da amostra: 02/10/15
	Data de entrega do resultado: 29/10/15

TEOR DE ÉSTER	Método: EN 14103		Limite: 96,5 min.		
79,0	% massa	N°LEQ: 175	Data: 06/10/15	Técnico: Andri	N° Técnico: 3

Amostra: Biodiesel Amostra 2	Nº da Amostra: 1075/15
	Data de entrada da amostra: 02/10/15
	Data de entrega do resultado: 29/10/15

TEOR DE ÉSTER	Método: EN 14103		Limite: 96,5 min.		
88,7	% massa	N°LEQ: 175	Data: 06/10/15	Técnico: Andri	N° Técnico: 3

Amostra: Biodiesel Amostra 3	Nº da Amostra: 1076/15
	Data de entrada da amostra: 02/10/15
	Data de entrega do resultado: 29/10/15

TEOR DE ÉSTER	Método: EN 14103		Limite: 96,5 min.		
77,3	% massa	N°LEQ: 175	Data: 06/10/15	Técnico: Andri	N° Técnico: 3

Resolução: ANP 45/2014			
Laboratórios:	( ) LQC	( ) LQC-B	(x) P&D
Nota: referido a emissão do RSQ-107			
Observação:			
Descarte da amostra:	( ) Reuso	( ) Descarte Classe 1	(✓) Devolvido ao cliente
Data: 06/10/15	ASSINATURA DO TÉCNICO RESPONSÁVEL: Andri		

Responsável pela emissão/revisão: Lorena	Responsável pela atualização: Patricia	Data da atualização: 02/10/2015

1 de 1

Apêndice 3. Laudo emitido pelo LACAUT (Laboratório de análise de combustíveis automotivos) com a porcentagem de ésteres nas amostras de biodiesel obtido via catálise química (amostra 2) e enzimática (amostra 3).