



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



# **Estudo de viabilidade de produção de biodiesel a partir de microalga *Chlorella pyrenoidosa* por catálise enzimática**

*Autor: Tobias Dierings*

*Orientadoras: Débora Jung Luvizetto Faccin e Rosane Rech*

*Coorientadora: Jakeline Poppe Todeschini*

Porto Alegre, junho de 2015.

Sumário	
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	4
2.1 Biodiesel	4
2.1.1 Transesterificação por catálise alcalina homogênea	5
2.1.2 Transesterificação por catálise ácida homogênea	6
2.1.3 Transesterificação por catálise enzimática heterogênea	6
2.2 Microalgas	9
2.2.1 Cultivo	10
2.2.2 Extração dos lipídeos	11
2.2.3 Composição dos ácidos graxos	14
2.3 Biodiesel de microalgas	15
3 Materiais e Métodos	16
3.1 Microalga	16
3.2 Escolha do método de extração	16
3.3 Análise de lipídeos totais	16
3.4 Quantificação dos ácidos graxos	17
3.5 Extração do óleo para os experimentos	18
3.6 Reação de transesterificação	18
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Lipídeos totais	20
4.2 Determinação do perfil de ácidos graxos	20
4.3 Reação de transesterificação por via enzimática	22
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	24
6 Referências	25

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente às pessoas que tiveram papel fundamental na realização desse trabalho. Um agradecimento a Wilson Jacques Junior, pela gentil doação de biomassa para realização dos experimentos. Tania Menegol pelo comprometimento e disponibilidade para contribuir na realização dos experimentos. Ao professor Rafael Costa Rodrigues por ter auxiliado no planejamento e viabilizado a realização ao ceder seu laboratório para o desenvolvimento das atividades. Às minhas orientadoras, Débora Jung Luvizetto Faccin, Jakeline Poppe Todeschini e Rosane Rech pelo apoio e interesse, além de disponibilizar os recursos necessários para conclusão desse trabalho.

Em um segundo momento gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram durante minha vida acadêmica. Os amigos que fiz, colegas de curso, companheiros de laboratório e colegas de trabalho. E principalmente aos meus pais, Leomar e Magda, que sempre me apoiaram em todos os momentos e com certeza são a razão por eu ter alcançado meus objetivos de vida até o momento.

## Resumo

Com o aumento das necessidades energéticas mundiais, o desenvolvimento de novas fontes de energia renovável se torna cada vez mais importante. A utilização de frações de biodiesel no diesel comercial já é uma realidade e possui um grande apelo para aumento de demanda visto que os preços do barril do petróleo tendem a aumentar a cada ano. Atualmente, em sua grande maioria, a matéria-prima utilizada para produção de biodiesel é derivada de sementes oleaginosas, competindo com o mercado mundial de alimentos. A utilização de biomassa de microalgas surge como uma alternativa promissora tendo em vista sua alta produtividade. A utilização de catálise por via enzimática na reação de transesterificação em escala industrial ainda possui diversas limitações, porém apresenta vantagens quando comparada com a via química. Nesse trabalho, o óleo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* foi extraído e analisado, verificando-se a viabilidade da produção de ésteres butílicos a partir do mesmo por transesterificação por via enzimática utilizando o derivado enzimático comercial Lypozime IM-RM da marca *Novozymes*<sup>®</sup>. Foram obtidos valores de lipídeos totais de até 21 % em massa de microalga seca. O resultado do perfil de ácidos graxos mostrou-se coerente com a bibliografia para essa espécie de microalga. Foi possível produzir ésteres butílicos de ácidos graxos a partir do óleo. O máximo de rendimento ocorreu na proporção álcool/óleo 10:1, proporções superiores diminuíram o rendimento da reação.

## Abstract

With the increase in global energy needs, the development of new sources of renewable energy becomes increasingly necessary. The use of biodiesel fractions in commercial diesel is already a reality and has a great appeal for high demand as oil barrel prices tend to rise each year. Actually, for the most part, the raw material used for biodiesel production is derived from oilseeds, competing with the global food market. The use of microalgae biomass is a potential alternative in view of its high productivity. The use of enzymatic catalysis in transesterification reaction on an industrial scale also has several limitations, however presents advantages compared with the chemical route. In this work, the oil from the microalgae *Chlorella pyrenoidosa* was extracted and analyzed, verifying the feasibility of the production of butyl esters by enzymatic transesterification using commercial enzyme derived Lypozime IM-RM from *Novozymes*®. Total lipid values of up to 21% by weight of dry microalgae were obtained. The result of the fatty acid profile was adequate with the literature for this kind of microalgae. It is possible to produce FABE's from the oil. The maximum yield was the ratio alcohol/oil 10:1, higher proportions decreased reaction yield.

## Lista de Figuras

Figura 1. Esquema da reação de transesterificação para produção de biodiesel (LOBO et al., 2009) .....	4
Figura 2. Resultados de rendimento para transesterificação enzimática de óleos vegetais utilizando diferentes lipases. (a) Óleo de soja; (b) Óleo de girassol; (c) Óleo de farelo de arroz. Negro: metanol; Branco: etanol; Cinza claro: propanol; Cinza escuro: butanol (RODRIGUES, 2009) .....	8
Figura 3. Microfotografia da microalga <i>C. pyrenoidosa</i> (D'OCA et al., 2011) .....	10
Figura 4. Fotobiorreatores para cultivo de microalga. Acima reatores do tipo placa e tubos, ao centro bioreatores com agitação mecânica e pneumática e abaixo reatores com iluminação natural e artificial respectivamente (CHAGAS, 2014).....	11
Figura 5. Diagrama esquemático do processo de extração por solvente (Adaptado de HALIM et al., 2012) .....	12
Figura 6. Aparato para extração pelo Método Soxhlet (Adaptado de DE CASTRO e AYUSO, 2000).....	13
Figura 7. Perfil dos ácidos graxos presentes nos lipídeos extraídos de microalga <i>Tetraselmis suecica</i> (Adaptado de HALIM et al., 2012).....	14
Figura 8. Reação de esterificação catalisada por BF <sub>3</sub> .....	17
Figura 9. Cromatograma dos ácidos graxos presentes no óleo extraído de <i>C. pyrenoidosa</i> . Identificação C14:0 (28,73 min), C16:0 (33,43 min), C16:1 (34,10 min), C17:0 (34,44 min), C18:1 (38,26 e 38,50), C18:2 (35,61 e 39,73 min), C18:3 (37,42 min e 40,35 min), C20:4 (41,42 min). .....	21
Figura 10. Cromatograma dos ésteres butílicos formados a partir do óleo de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> por transesterificação por catálise enzimática com proporção álcool/óleo 10:1. Identificação: C16:0 (18,50 min), C17:0-Padrão (20,30 min), C18:1 (21,44 min), C18:2 e C18:3 (21,72 min), C20:4 (23,22 min).....	22
Figura 11. Resultados de rendimento da produção de ésteres butílicos (biodiesel) sob diferentes condições de proporção álcool/óleo no meio reacional e tempo de reação ....	23

---

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação de diversos métodos para a extração de lipídeos da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> (Adaptado de ARAUJO et al., 2013) .....	14
Tabela 2. Propriedades do biodiesel produzido a partir de biomassa de <i>S. obliquus</i> por catálise enzimática utilizando a lipase <i>P. fluorescens</i> em comparação com as normativas americana e europeia (Adaptado de GULDHE et al., 2015) .....	15
Tabela 3. Rendimento da extração de lipídeos totais de biomassa de <i>C. pyrenoidosa</i> .....	20
Tabela 4. Perfil de ácidos graxos na biomassa de <i>C. pyrenoidosa</i> e obtido da literatura ...	21

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

OPEP – *Organização dos Países Exportadores de Petróleo*

ANP – *Agência Nacional do Petróleo*

EIA - *U.S. Energy Information Administration*

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acid*

FABE – *Fatty Acid Butyl Esters*

FAME – *Fatty Acid Methyl Esters*



## 1 Introdução

A partir do desenvolvimento do motor a diesel no final do século XIX foi possível obter uma maior eficiência em relação ao motor a gasolina. Esse motor de combustão interna de alta eficiência permitiu movimentação de veículos pesados tais como locomotivas, caminhões e geradores de eletricidade. Além destes, esse tipo de motor também é utilizado em veículos automotores de menor porte devido à economia de combustível proporcionada se comparado aos motores onde o combustível é a gasolina, porém seu valor de mercado é maior.

Desde a década de 1920 a produção em massa de veículos automotores propiciada por ideologias como o fordismo tornaram popular o consumo desses bens, fazendo-os cada vez mais necessários no cotidiano e aumentando conseqüentemente a demanda de combustíveis. Durante todo o século XX as fontes de energia utilizadas foram em sua quase totalidade de origem fóssil. Isso se deve a rentabilidade da extração e processamento do petróleo, matéria de grande poder calorífico e abundante no planeta durante esse período.

Porém segundo Mohr et al. (2015) no decorrer do século XXI a disponibilidade de combustíveis a partir de petróleo tende a diminuir e em contramão o consumo aumentar, havendo a necessidade de inserção de novas fontes renováveis de energia.

Atualmente cerca de 80 % das necessidades energéticas mundiais são supridas através de combustíveis fósseis. Em todo mundo, o consumo de petróleo e outros combustíveis líquidos deve aumentar de 87 milhões de barris por dia em 2010 para 97 milhões de barris por dia em 2020. Estima-se que esse número deva subir para 115 milhões até 2040 (EIA, 2013).

O preço do petróleo pode ser influenciado por diversos fatores tais como expectativa da demanda e produção futura de combustíveis, decisões políticas tomadas pela OPEC, além da oferta e demanda no mercado mundial de petróleo e outros combustíveis líquidos (EIA, 2014).

O biodiesel e o bioetanol são dois tipos de combustíveis de origem renovável com grande potencial de substituição dos atuais combustíveis de origem fóssil, devido à

similaridade das propriedades físico-químicas com a dos combustíveis utilizados atualmente na maioria dos veículos.

A crise do óleo na década de 1970 influenciou muitos países, entre eles o Brasil, a procurar por alternativas para substituir os combustíveis fósseis. Um exemplo é o programa PROÁLCOOL que estimulou pesquisas, produção e distribuição de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, além de influenciar a indústria automobilística a projetar motores cujo combustível exclusivo é o etanol. Em seguida foram desenvolvidos motores chamados flex, cujo combustível pode ser tanto gasolina quanto o álcool (SADEGHINEZHADA et al., 2013).

Segundo a *U.S. Energy Information Administration* (2014), as projeções estimam que a demanda de diesel aumente e a de gasolina diminua, principalmente nos países da União Europeia e Estados Unidos onde há tendência de utilização de combustíveis com maior eficiência e menor emissão de poluentes. Dessa maneira, estima-se que as refinarias aumentem a produção de diesel, resultando em uma diferença crescente no preço dos dois combustíveis nos próximos anos.

O biodiesel pode ser produzido a partir da reação de transesterificação de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal. Entre as diversas fontes de matéria-prima possíveis estão as sementes oleaginosas (soja, canola, girassol, palma e algodão), sebo animal, óleo de frituras e microalgas. Segundo a Agência Nacional de Petróleo (2015), cerca de 75 % da produção brasileira de biodiesel têm como matéria-prima a soja.

Atualmente no Brasil existem 59 unidades produtoras de biodiesel cujo funcionamento é autorizado pela ANP (2015). Desde que o programa de biodiesel foi implantado no Brasil em 2006 a produção aumenta a cada ano, chegando atualmente a média de 300.000 m<sup>3</sup> de biodiesel produzidos no país por mês, sendo o óleo de soja (75,6 %) e a gordura bovina (20,4 %) as maiores fontes de matéria-prima. Segundo o Diário Oficial da União (2014) atualmente a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado é de 7 %.

O biodiesel produzido a partir de biomassa proveniente de cultivos de microalga é uma opção bastante promissora visto que além de capturar dióxido de carbono durante seu cultivo, não compete com o mercado alimentício, pode ser cultivada em terrenos não férteis e possui um alto rendimento por área.

Para a reação de transesterificação podem ser utilizados catalisadores químicos ou enzimáticos. Atualmente, os catalisadores empregados na indústria são em sua maioria homogêneos alcalinos, devido à alta eficiência. Porém, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver catalisadores heterogêneos enzimáticos, cujas principais vantagens são o reuso de catalisador, a redução da quantidade de efluentes e simplificação do processo de purificação do biodiesel (LOBO et al., 2009).

Esse trabalho tem como objetivo principal estudar a viabilidade da produção de biodiesel, a partir da reação de transesterificação por catálise enzimática de óleo extraído da microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Os objetivos específicos são:

- Estudar procedimentos de extração e definir um método para a realização dos experimentos, viabilizando a máxima extração dos lipídeos presentes na biomassa.
- A partir do método definido, extrair e verificar o rendimento de lipídeos totais e quantificar os ácidos graxos presentes no óleo.
- Verificar a viabilidade da utilização desse tipo de microalga para produção de biodiesel.
- Produzir biodiesel por transesterificação enzimática.
- Verificar a influência da proporção óleo/álcool no rendimento da reação.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia e no Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática do Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Biodiesel

O biodiesel por definição é um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005). Esse combustível é composto por alquil ésteres de ácidos graxos produzidos a partir da reação de transesterificações de óleos de origem vegetal ou animal (SADEGHINEZHADA et al., 2013).

A reação de transesterificação está demonstrada na Figura 1.

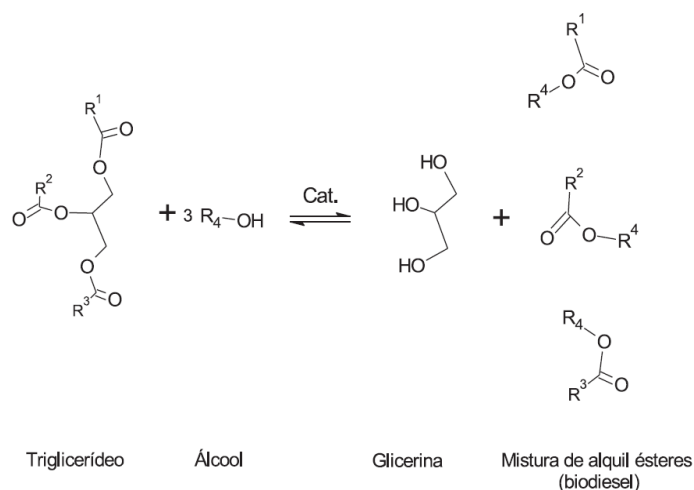


Figura 1. Esquema da reação de transesterificação para produção de biodiesel (LOBO et al., 2009)

Os parâmetros de qualidade do biodiesel são definidos no Brasil pela norma ANP 07/2008. Em comparação com o diesel mineral, o biodiesel apresenta uma maior massa específica e viscosidade. A quantidade de energia fornecida é cerca de 10 % menor em comparação com o diesel, porém o seu desempenho no motor é praticamente o mesmo em relação à potência e ao torque (LOBO et al., 2009).

Além de utilizar fontes renováveis para sua produção, existem outros benefícios relacionados com a utilização de biodiesel em substituição ao diesel comum. Entre eles está a redução das emissões de particulados, compostos aromáticos e monóxido de carbono devido à combustão completa proporcionada pela maior presença de oxigênio nas moléculas do biocombustível em comparação ao combustível de origem fóssil (SHAHIR et al., 2015).

A alta concentração de enxofre no diesel comum aumenta a emissão de particulados, os danos à saúde e a corrosão do motor devido à formação de ácidos sulfúricos e sulfônicos. Segundo Lobo et al. (2009) a adição de biodiesel ao diesel mineral auxilia também na correção da concentração de enxofre no combustível e no aumento da lubricidade do mesmo.

A reação de transesterificação pode ser catalisada heterogênea ou homogeneamente, seguem abaixo as 3 vias de reação discutidas por Vyas et al. (2010) e Dermirbas (2009) em seus trabalhos.

### 2.1.1 *Transesterificação por catálise alcalina homogênea*

No método de transesterificação por catálise alcalina, os catalisadores mais utilizados são o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH). O catalisador é dissolvido em um álcool de cadeia curta, usualmente metanol. Essa mistura é bombeada para o reator, onde se encontra o óleo. A reação dura em média duas horas a 340 K e pressão ambiente, produzindo duas fases: éster e glicerol cru.

O mecanismo da reação é definido em três etapas. A primeira é a reação da base com o álcool, produzindo alcóxido e o catalisador protonado. Na segunda etapa ocorre então um ataque nucleofílico do alcóxido ao grupo carbonila dos triglicerídeos formando um intermediário, a partir do qual o alquil éster e o ânion correspondente são formados. Os diglicerídeos e monoglicerídeos são convertidos pelo mesmo mecanismo formando o produto final: uma mistura de alquil ésteres e glicerol.

A reação é reversível, sendo assim é necessária a utilização de excesso de álcool com o objetivo de aumentar o rendimento e facilitar a formação da fase de glicerol. Esse método tem rendimentos elevados porém é altamente sensível à umidade e alta concentração de ácidos graxos livres no óleo.

Atualmente, a catálise química alcalina é utilizada amplamente na indústria por apresentar uma alta eficiência e um custo relativamente baixo, apesar de dificuldades na purificação do produto. São requeridas operações de *downstream* para remoção do catalisador e álcool não reagido, além de lavagens de produto para atingir a pureza requerida.

### 2.1.2 *Transesterificação por catálise ácida homogênea*

Os principais catalisadores utilizados nesse método são ácido sulfúrico, ácido sulfônico e ácido clorídrico. O método é similar ao de catálise alcalina, porém com uma cinética mais lenta. Uma das maiores vantagens da utilização de catalisadores ácidos é a possibilidade de produzir biodiesel a partir de óleos com alta concentração de ácidos graxos livres (maior que 6%), geralmente óleos e graxos de reuso.

O excesso de álcool aumenta o rendimento pois favorece a formação de alquil ésteres. No entanto, uma quantidade maior dificulta a posterior recuperação de glicerol. Em média o tempo de reação utilizando como catalisador o ácido sulfúrico é de 9 h e a temperatura de 370 K.

### 2.1.3 *Transesterificação por catálise enzimática heterogênea*

Em seus estudos, Huang et al. (2015) e Zhao et al. (2015) descrevem a tecnologia e avanços na área de produção de biodiesel por catálise enzimática.

A utilização de catálise enzimática é atrativa principalmente pela fácil purificação dos produtos, mínima formação de efluentes, fácil recuperação de glicerol e ausência de reações laterais. Portanto, produz um produto de alta pureza com pouca ou nenhuma operação *downstream*. No entanto, a principal dificuldade é o alto custo das lipases.

Muitas pesquisas na área são motivadas pela perspectiva do desenvolvimento de tecnologias mais limpas. A reutilização da lipase é fundamental para que se possa cumprir o objetivo de tornar seu uso viável economicamente e, para isso, utiliza-se a imobilização. O objetivo da imobilização é tornar o derivado estável, ativo e seletivo (RODRIGUES, 2009).

#### 2.1.3.1 Imobilização de lipases

A imobilização enzimática é definida como o confinamento físico da enzima em um determinado suporte, mantendo sua atividade catalítica. Esse processo viabiliza a recuperação e o reuso do biocatalisador, além de aumentar a tolerância do mesmo a fatores como pH, temperatura e presença de reagentes. Os principais suportes utilizados segundo a literatura são resinas, sílica, cerâmicas, nanotubos de carbono e partículas

magnéticas. Para o uso em escala industrial os principais fatores a serem levados em conta são o custo, facilidade de imobilização e manutenção da atividade.

Os principais métodos de imobilização são: adsorção física, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada. Muitos processos estão sendo desenvolvidos na área de imobilização de lipases, entretanto, apesar disso, somente alguns processos foram satisfatórios para serem comercializados. A lipase comercial imobilizada Novozym® 435 é mais citada na literatura para a produção de biodiesel.

Em 2006 a primeira planta industrial que utiliza a catálise enzimática foi construída na China com capacidade de 20.000 t/ano de biodiesel, utilizando Novozym® 435 no processo. Em 2007, outra unidade produtora de biodiesel, também na China, com metade da capacidade da primeira entrou em operação, porém utilizando como biocatalisador *Candida* sp. imobilizada em membranas têxteis.

#### 2.1.3.2 Processo e parâmetros envolvidos

A reação em escala laboratorial se dá geralmente em frascos sob agitação em *shaker* com a operação em batelada, porém para operar em escala industrial a operação contínua tem maior aplicabilidade devido à alta produtividade. Pode-se utilizar multi-estágios de reatores com enzimas de diferentes idades/atividades e com contínua remoção de glicerol. O tempo de operação pode chegar a 70 dias, regenerando a lipase por lavagem em terc-butanol.

Os principais parâmetros da reação de transesterificação enzimática são o conteúdo de água, massa de biocatalisador, razão álcool/óleo e temperatura.

É necessária uma mínima quantidade de água para manter a atividade e estabilidade enzimática, porém a água pode afetar a taxa de reação e o rendimento. Ao aumentar a quantidade de água no meio reacional, mais gotículas de óleo-água podem ser formadas, incrementando a área interfacial disponível e aumentando a taxa de reação. Porém, uma concentração muito alta de água pode reduzir o rendimento ao diminuir a concentração dos grupos alquila e aumentar a hidrólise dos glicerídeos para a forma de ácidos graxos.

Os álcoois mais utilizados são o metanol, etanol, isopropanol, 2-propanol, *n*-butanol e isobutanol. Sendo o metanol o mais utilizado para produção de biodiesel devido ao

relativo baixo custo e a alta taxa de reação. São necessários 3 mols de álcool para converter 1 mol de glicerídeos, no entanto na prática é utilizado excesso de álcool de forma a aumentar o rendimento dessa reação reversível. Porém, utilizar altas proporções de álcool (especialmente o metanol) reduz significativamente a atividade enzimática, sendo assim a proporção álcool/óleo um importante fator a ser estudado.

Em seu estudo, Rodrigues (2009) avaliou o rendimento da reação de transesterificação de óleos vegetais utilizando diferentes combinações de álcoois e lipases. As condições de reação foram: temperatura de 30 °C, razão molar álcool/óleo de 7.5:1, 15 % de enzima e 4 % de água em porcentagem mássica total e tempo de reação de 6 h. Os resultados, dispostos na Figura 2, mostram que é possível obter resultados de rendimento diferentes ao variar-se a combinação álcool/enzima no meio reacional.

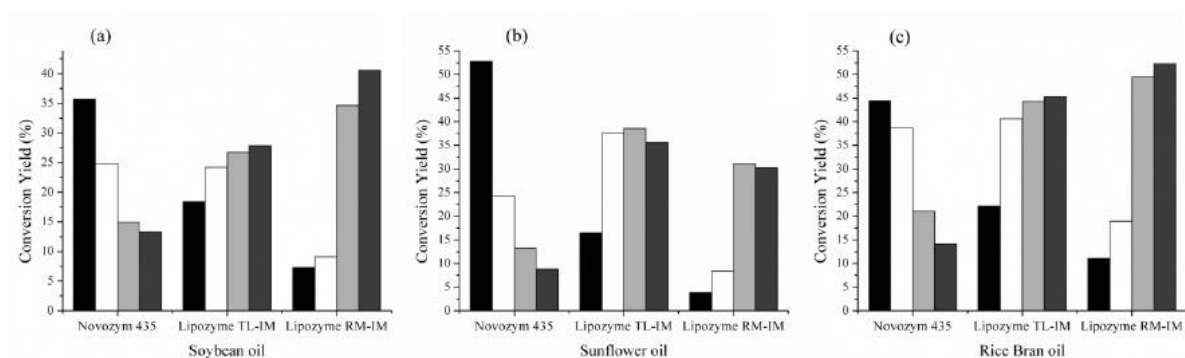


Figura 2. Resultados de rendimento para transesterificação enzimática de óleos vegetais utilizando diferentes lipases. (a) Óleo de soja; (b) Óleo de girassol; (c) Óleo de farelo de arroz. Negro: metanol; Branco: etanol; Cinza claro: propanol; Cinza escuro: butanol (RODRIGUES, 2009)

A temperatura afeta diretamente a taxa de reação. Porém ao atingir-se uma certa temperatura ocorre a inativação e a redução da atividade catalítica. A dependência com este parâmetro é uma grande vantagem em relação à catálise química visto que utilizam-se faixas de temperatura mais brandas reduzindo o gasto energético do processo.

A agitação também é um fator importante. Uma boa mistura aumenta o contato entre o substrato e o biocatalisador, além de prover uma boa dispersão da lipase no meio reacional. Com a resistência à transferência de massa diminuída aumenta-se a taxa de reação.

Para atingir os parâmetros estabelecidos pelas normativas nacionais é necessário purificar os produtos da reação de transesterificação. As impurezas podem incluir ácidos



graxos livres, água, álcool, glicerídeos, metais e glicerol. No processo convencional geralmente remove-se primeiramente o glicerol por métodos de diferença de massa específica. Segue-se então para a remoção de metais alcalinos do biodiesel por lavagem com água destilada. Essa etapa gera uma grande quantidade de efluentes, porém no processo biocatalítico a concentração de metais é nula, sendo assim o processo é ecologicamente correto.

## 2.2 Microalgas

Microalgas são microrganismos unicelulares que podem ser classificadas em procariontes e eucariontes. Estima-se que existam mais de 50 mil espécies sendo que 30 mil já foram estudadas e analisadas. As espécies eucariontes autotróficas são fotossintetizantes e tem potencial para produzir biocombustíveis e outros produtos de alto valor agregado a partir da produção em grande escala de biomassa (RASHID et al., 2014).

Para seu crescimento são necessários água, nutrientes inorgânicos, luz e dióxido de carbono. Durante a produção de 100 t de microalgas são fixadas cerca de 183 t de CO<sub>2</sub>. Aproximadamente metade da massa seca de biomassa algal corresponde a carbono (CHISTI, 2007).

Mata *et al.* (2010) descrevem como alterações nas condições de cultivo afetam o crescimento e composição da biomassa. Variáveis importantes durante o cultivo são: temperatura, intensidade luminosa, pH, aeração e concentração de nitrato e nitrogênio. Um pH ácido do meio de cultivo pode inibir o crescimento, bem como uma deficiência na aeração do meio diminui o contato das células com os nutrientes e facilita a decantação, diminuindo a taxa de crescimento de biomassa.

Algumas espécies de microalga são capazes de acumular uma quantidade significativa de lipídeos na sua estrutura. Espécies como *Botryococcus braunii* (conteúdo lipídico de 25 a 75 %), *Chlorella sp.* (28 a 32 %), *Scenedemus sp.* (20 a 21 %) e *Nannochloropsis sp.* (31 a 68 %) foram identificadas como as mais promissoras para cultivo em larga escala para produção de biomassa e subsequente conversão em biodiesel (LAM e LEE, 2013).

A espécie de microalga *Chlorella pyrenoidosa* é amplamente utilizada como complemento alimentar e possui uma estrutura simples que pode ser observada na Figura 3. Os modos de nutrição dessa espécie podem ser autotróficos, heterotróficos ou mixotróficos.

Segundo o estudo de Wong (1981), a espécie *C. pyrenoidosa* apresenta uma maior taxa de crescimento de biomassa quando cultivada em águas residuais do que em meio de cultivo Bristol. Estudos mais recentes como o de Yang et al. (2015) comprovam que o cultivo dessa espécie de microalga tem alta eficiência de remoção de fósforo e nitrogênio de efluentes.

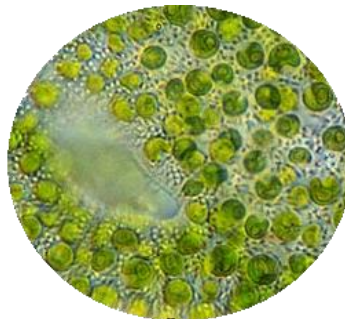


Figura 3. Microfotografia da microalga *C. pyrenoidosa* (D'OCA et al., 2011)

É possível alterar a produção de lipídeos e pigmentos através do controle de parâmetros das condições de cultivo, tais como pH, temperatura, concentração de nitrato, intensidade luminosa. Segundo Wu e Miao (2014) consegue-se obter, por exemplo, concentrações de até 54,5 % de lipídeos na biomassa da microalga *C. pyrenoidosa* ao cultivá-la com deficiência de nitrato no meio de cultivo.

### 2.2.1 Cultivo

De modo a reduzir os custos da produção de biomassa em grande escala é necessário aproveitar ao máximo a luz solar. Existem dois tipos de sistema de cultivo de microalga: interno ou externo. Em cultivos internos geralmente utilizam-se fotobiorreatores (Figura 4) onde há um controle rigoroso sobre as variáveis do processo, obtendo-se assim uma biomassa com propriedades consistentes. Essa forma de cultivo possui um custo elevado, reduzindo o interesse da utilização desse tipo de local para produção de biomassa para a indústria de biodiesel (CHISTI, 2007).

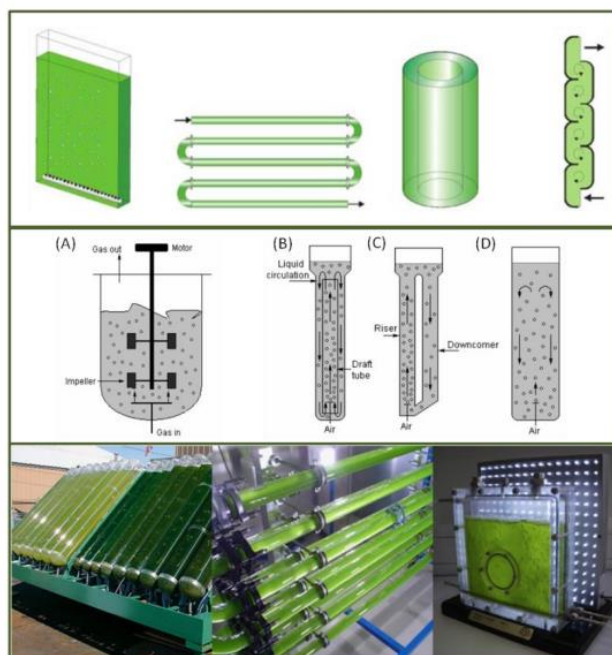


Figura 4. Fotobiorreatores para cultivo de microalga. Acima reatores do tipo placa e tubos, ao centro bioreatores com agitação mecânica e pneumática e abaixo reatores com iluminação natural e artificial respectivamente (CHAGAS, 2014)

Os cultivos externos são realizados através de lagoas ou fotobiorreatores abertos, onde os parâmetros como intensidade luminosa e temperatura variam de acordo com as condições climáticas. Dessa maneira, a composição da biomassa final bem como as taxas de crescimento podem variar durante o período do ano, afetando diretamente a produção (CHISTI, 2007).

Após o cultivo há a necessidade da recuperação de biomassa proveniente do meio de cultura. Esse processo envolve geralmente processos de sedimentação, centrifugação ou filtração. Vários estudos são realizados na área com o objetivo de reduzir os custos envolvidos. Segundo Mata et al. (2010) essa etapa pode contribuir entre 20 % e 30 % no custo do processo.

### 2.2.2 Extração dos lipídeos

A extração é o processo onde a biomassa algal é exposta a um solvente que remove os lipídeos da matriz celular. Essa etapa requer uma grande especificidade de modo a evitar a extração de contaminantes como proteínas e carboidratos que podem aumentar os custos nos processos *downstream* de fracionamento e purificação do biodiesel, além

de ser mais específico na extração de acilgliceróis do que outras frações lipídicas que não são facilmente convertidas em biodiesel (HALIM et al., 2012).

O mecanismo da extração pode ser descrito em 5 etapas, conforme a Figura 5:

- 1) Penetração do solvente orgânico através da membrana celular.
- 2) Interação do solvente orgânico com os lipídeos.
- 3) Formação de complexo solvente-lipídeo.
- 4) Difusão do complexo através da membrana celular.
- 5) Difusão do complexo através do filme estático de solvente *bulk*.

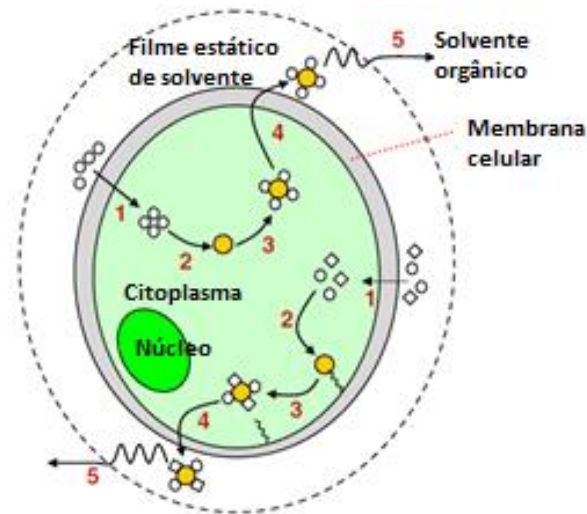


Figura 5. Diagrama esquemático do processo de extração por solvente (Adaptado de HALIM et al., 2012)

Vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de otimizar a extração lipídica. Em seus trabalhos, Halim *et al.* (2012), De Castro e Ayuso (2000) e Araujo *et al.* (2013) apresentam os principais métodos de extração utilizados.

#### a) Método Soxhlet

Nesse método o solvente orgânico é aquecido até a ebulição e condensado. Entra em contato com a amostra, extraíndo os lipídeos e outros compostos solúveis. Quando se atinge o nível máximo, o solvente retorna ao frasco inicial por um sistema de sifão. Repete-se a extração por um número de ciclos estabelecidos até que a extração esteja concluída. O solvente mais comumente utilizado é o hexano e o esquema está demonstrado na Figura 6.

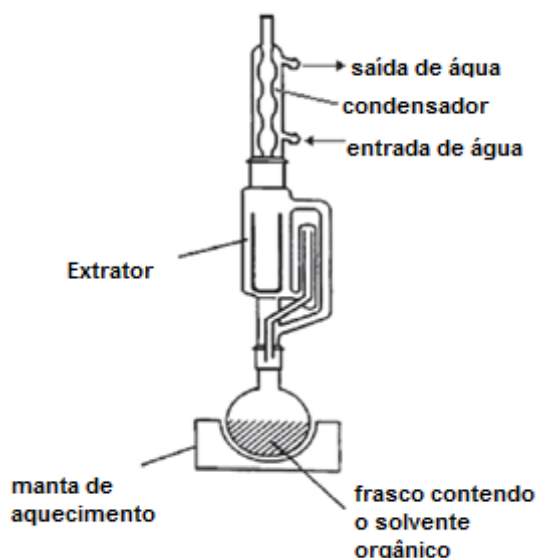


Figura 6. Aparato para extração pelo Método Soxhlet (Adaptado de DE CASTRO e AYUSO, 2000)

As vantagens desse método são a economia de solvente e o deslocamento do equilíbrio ao manter-se sempre o solvente puro em contato com a amostra. A principal desvantagem é a utilização de altas temperaturas, requerendo um desprendimento energético alto, além da possibilidade de decomposição de compostos termo sensíveis do óleo.

#### b) Método Bligh and Dyer

Esse método pode ser utilizado em amostras com altos teores de umidade e realiza uma extração a frio utilizando três solventes: metanol, clorofórmio e água. Na primeira etapa os três solventes são adicionados em proporção 2:1:0,8 de modo a formar apenas uma fase. Permanecendo em contato com a amostra sob agitação. Em seguida adiciona-se mais clorofórmio e água de maneira a formar duas fases: orgânica contendo a fração de lipídeos e outra aquosa com as proteínas e carboidratos.

Essa metodologia apresenta a vantagem de extrair todas as classes de lipídeos, sejam polares ou apolares devido à combinação das propriedades dos solventes. Além de evitar a deterioração dos lipídeos ao utilizar a temperatura ambiente, podendo-se determinar a partir do extrato teor de carotenoides, teor de ácidos graxos e composição de ácidos graxos, por exemplo. A maior desvantagem está na alta toxicidade do clorofórmio.

Além dos acima citados existem diversos métodos que utilizam diferentes solventes ou combinações para a extração dos lipídeos, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Comparação de diversos métodos para a extração de lipídeos da biomassa de *Chlorella vulgaris* (Adaptado de ARAUJO et al., 2013)

Método	Solvente	Rendimento (%)
Bligh and Dyer (1959)	Clorofórmio/Metanol/Água	52,5 ± 2,3
Soxhlet	Hexano	1,8 ± 0,3
Chen (1981)	Metanol/Diclorometano	10,9 ± 1,2
Folch et al. (1957)	Clorofórmio/Metanol	16,1 ± 0,8
Hara and Radlin (1978)	Isopropanol/Hexano	2,2 ± 0,2

### 2.2.3 Composição dos ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos presentes na massa de óleo extraída depende da espécie de microalga. Em seu estudo, Halim *et al.* (2012) consideram que o óleo extraído de *Tetraselmis suecica* possui um perfil requerido de ácidos graxos para produção de biodiesel de alta qualidade (Figura 7), sendo os principais componentes C16:0, C18:1 e C18:2. Um óleo com baixo grau de insaturações produz um biodiesel com maior resistência e estabilidade oxidativa. Ácidos graxos com 3 ou mais insaturações (PUFA's) são indesejados pois são responsáveis pela baixa volatilidade, baixa estabilidade a oxidação e aumento da tendência à formação de espuma durante a reação de transesterificação.

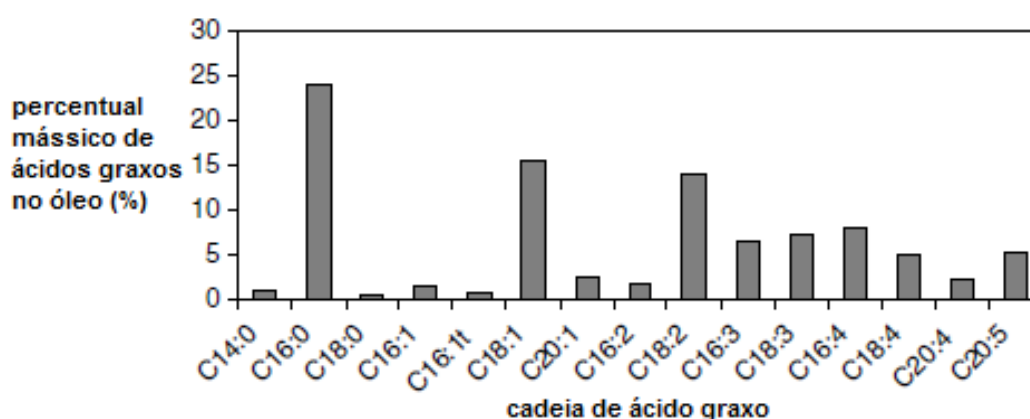


Figura 7. Perfil dos ácidos graxos presentes nos lipídeos extraídos de microalga *Tetraselmis suecica* (Adaptado de HALIM et al., 2012)

### 2.3 Biodiesel de microalgas

Entre as vantagens da utilização de microalgas para a síntese de biodiesel estão o rápido crescimento (em torno de 100 vezes mais rápido que as plantas), o maior rendimento da produção de biomassa proveniente de microalgas que pode variar entre 15 e 25 t/ (ha ano), enquanto a soja produz cerca de 0,4 t/ (ha ano) e a maior taxa de absorção de CO<sub>2</sub> durante o seu crescimento (RASHID et al., 2014).

Chisti em seus trabalhos publicados em 2007 e 2008 expõe diversos argumentos de que a produção de biodiesel a partir de biomassa algal tem um futuro promissor. Sua produção e utilização podem tornar-se economicamente mais atrativos do que o etanol, uma vez que se desenvolvam tecnologias que reduzam os custos de cultivo, devido ao potencial energético elevado do biodiesel.

Segundo o estudo de Guldhe et al. (2015), as propriedades do biodiesel produzido a partir de biomassa da microalga *S. obliquus* atendem aos requisitos mínimos exigidos pela normativas americana (ASTM 6751) e europeia (EN 14214), conforme Tabela 2. Porém, esse tipo de biodiesel tem a desvantagem de ser mais suscetível a oxidação durante a armazenagem o que diminui o tempo de vida útil do mesmo, devido à grande concentração de ácidos graxos poli-insaturados no óleo cru (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Tabela 2. Propriedades do biodiesel produzido a partir de biomassa de *S. obliquus* por catálise enzimática utilizando a lipase *P. fluorescens* em comparação com as normativas americana e europeia (Adaptado de GULDHE et al., 2015)

Características do biodiesel	Unidade	Biodiesel de <i>S. obliquus</i>	ASTM 6751	EN 14214
Número de cetano	-	51,77	min 47	min 51
Massa específica	Kg/m <sup>3</sup>	877	860-900	860-900
Valor ácido	mgKOH/g	0,42	max 0,8	max 0,5
Estabilidade oxidativa	h	3,54	min 3	min 3
Enxofre total	wt %	<0,001	max 0,05	-

Utilizando a reação transesterificação por via enzimática, Lai et al. (2012) e Tran et al. (2012) conseguiram obter rendimentos de até 90,7 % e 97,3 % na produção de ésteres, respectivamente, a partir do óleo extraído de *Chlorella vulgaris*. Os testes foram realizados com lipases de *Penicillium expansum* (PEL) e *Candida antarctica B* (Novozym® 435) no primeiro trabalho e no segundo com a lipase *Burkholderia sp.*

### 3 Materiais e Métodos

De maneira a cumprir com os objetivos do trabalho os experimentos tiveram o planejamento descrito a seguir. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico das marcas Sigma-Aldrich e Dinâmica.

#### 3.1 Microalga

Foram obtidas duas amostras de biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* comercial, das marcas Green Boost® e Green Gem®. As duas possuem o mesmo fornecedor taiwanês *Taiwan Chlorella Manufacturing Company*, porém são embaladas por empresas brasileiras distintas e por isso a composição da biomassa pode sofrer alterações entre os lotes. Ambas encontram-se na forma de cápsulas, que foram trituradas de modo a maximizar a superfície de contato e melhorar a extração dos lipídeos.

#### 3.2 Escolha do método de extração

A composição celular de *C. pyrenoidosa*, segundo D'Oca et al. (2011), apresenta uma grande quantidade de lipídeos polares e neutros complexados em estruturas polares. Visando maximizar a extração dos lipídios e dessa forma obter a maior quantidade de óleo optou-se pelo método Bligh and Dyer (1959). Esse método possibilita a extração tanto dos lipídeos polares como dos lipídeos apolares complexados em sistemas polares ao mesclar as propriedades do clorofórmio, metanol e da água.

#### 3.3 Análise de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram determinados seguindo o método de Bligh and Dyer (1959). Foram pesados em torno de 1,0 g de biomassa em pó, adicionou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Deixou-se em agitação magnética por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de uma solução aquosa de sulfato de sódio (15 g/L). Em seguida verteu-se o conteúdo em uma pera de decantação de modo a separar as fases.

A fase orgânica é a fase mais densa. A mesma foi vertida em um erlenmeyer, passando por um filtro com sulfato de sódio anidro para remover resquícios de umidade.



Para o cálculo da quantidade de lipídeos, foram coletados 5 mL da fase orgânica que foi deixada em estufa por 20 minutos para remover o solvente. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

### 3.4 Quantificação dos ácidos graxos

Após obter os resultados de lipídeos totais na biomassa passou-se para a etapa de caracterização dos ácidos graxos que compõem o óleo. Para ser possível a análise dos ácidos graxos totais presentes no óleo de microalga *C. pyrenoidosa* é necessário saponificar e posteriormente esterificar o óleo. Esse procedimento baseia-se na quebra da molécula de triacilglicerol, pela reação de saponificação, formando glicerol e sais de metais alcalinos, ao mesmo tempo em que ocorre a reação de derivatização (Figura 8) que corresponde ao deslocamento do metal alcalino pela metila do metanol presente no meio reacional.

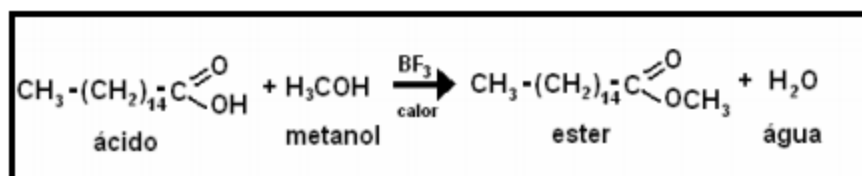


Figura 8. Reação de esterificação catalisada por BF<sub>3</sub>

O procedimento utilizado nesse trabalho foi baseado no método de Herman (1964) para a esterificação com metanol. Para isso, submeteu-se a biomassa em pó ao método de extração de Bligh and Dyer (1959), da mesma forma que o procedimento de lipídeos totais. Foram coletadas amostras de 1 mL em tubos de ensaio e o solvente foi removido através de arraste em atmosfera inerte de nitrogênio, com o objetivo evitar a degradação e conservar as características dos ácidos graxos presentes no óleo extraído.

Foram adicionados 2 mL de éter de petróleo à amostra, agitou-se em vórtex, adicionando em seguida 2 mL de solução de 0,5 M de NaOH em metanol ao tubo, agitando por mais 1 min e colocou-se o tubo em um banho de água em ebulição por 15 min. Resfriou-se e foram adicionados 2 mL de solução de trifluoreto de boro 13 % em metanol. Após agitação vigorosa retornou-se o tubo para o banho em ebulição por mais 20 min.

Após esse período, deixou-se o tubo esfriar e foram adicionados 3 mL de solução saturada de NaCl e 4 mL de éter de petróleo. Após agitação houve a separação das fases e foi possível coletar 1 mL da fase superior contendo éter e ésteres metílicos de cada tubo e depositá-los em *vial*. Secou-se o solvente por arraste em atmosfera inerte de nitrogênio e armazenaram-se as amostras sob congelamento (- 23 °C).

De maneira a quantificar a massa de óleo por volume de amostra com solvente foram coletados 1 mL da amostra em duplicata e adicionados a béqueres previamente pesados que foram colocados em estufa por 20 min.

As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 Shimadzu® equipado com amostrador automático e injetor com detector de ionização de chama. A coluna utilizada é de sílica fundida com 30 m x 0,25 mm e 0,2 µm de espessura de película. O perfil de ácidos graxos foi determinado utilizando o manual do equipamento como referência. Hexano foi utilizado como solvente de lavagem, o injetor com temperatura fixada em 240 °C e hidrogênio como gás de transporte com injeção constante de 1 mL/min. A detecção foi realizada por espectrofotômetro de ionização de chama (FID) sob temperatura de 260 °C com taxa de fluxo de injeção de gás hidrogênio de 40 mL/min e de ar a 400 mL/min. O forno teve temperatura inicial fixada em 50 °C e que foi aumentada até 250 °C, com gradiente de 10 °C/min.

### **3.5 Extração do óleo para os experimentos**

Após a análise da viabilidade da extração e caracterização do óleo, procedeu-se para a etapa de obtenção de massa suficiente de óleo para realização dos experimentos. Para tal finalidade utilizou-se o mesmo método Bligh and Dyer (1959) para uma biomassa de aproximadamente 50 g.

### **3.6 Reação de transesterificação**

Conforme estudo preliminar foram avaliados os parâmetros importantes para a reação de transesterificação: proporção álcool/óleo, temperatura, massa de catalisador e massa de água. Para a realização dos experimentos houve a necessidade de definir o biocatalisador e o álcool.

Com o objetivo de utilizar um álcool menos tóxico que o metanol, optou-se pela utilização do n-butanol. Além desse argumento, esse álcool apresenta a vantagem de ser

um produto de processos fermentativos. Para definir o biocatalisador observou-se o perfil de ácidos graxos e comparou-se com o perfil dos três óleos do trabalho de Rodrigues (2009). Optou-se pelo derivado imobilizado Lypozime IM-RM da marca Novozymes® por apresentar melhores resultados de rendimento quando o álcool utilizado foi o butanol.

Cerca de 0,5 g de massa de óleo foi adicionada a cada frasco *erlenmeyer* de 50 mL. Em seguida, adicionou-se a massa de n-butanol e homogeneizou-se a mistura. Após, juntou-se a massa de biocatalisador Lypozime IM-RM e água. Os frascos foram incubados em banho térmico a 37 °C com agitador orbital. Foram coletados pontos em 6 h e 18 h de reação. Os experimentos foram realizados em duplicata, verificando a influência da proporção álcool/óleo em 10:1, 15:1 e 20:1. As massas de água e biocatalisador foram 5 % e 15 % respectivamente, em relação a massa de óleo.

Ao final da reação o conteúdo foi vertido em tubo falcon, adicionando-se em seguida o dobro do volume coletado de água destilada, seguido de centrifugação a 3000 g a 4°C por 15 min. A fase superior, contendo biodiesel, foi analisada com base na norma europeia EN 14103 que indica o uso de padronização interna com heptadecanoato de metila. Foram pesadas cerca de 50 mg de amostra e adicionado 1 mL de solução padrão de concentração 10 mg/mL, que foram injetadas em cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 Shimadzu. O aparelho estava equipado com um detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar DB1 (30 m x 0,25 milímetros ID x 0,25 mM; J & W Scientific). A temperatura do injetor foi de 300 °C, razão de split = 1:30 e a temperatura do detector FID foi de 310 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma vazão de 1,0 mL/min. A rampa de aquecimento da coluna foi: temperatura inicial de 50 °C, velocidade de aquecimento de 10 °C/min atingindo uma temperatura final de 310 °C. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µl, e o tempo total da análise foi de 30 min. Para o cálculo do rendimento foi utilizada a Equação 1:

$$C = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\% \quad (1)$$

Sendo os parâmetros:

C = teor de biodiesel na amostra (%)

$\Sigma A$  = somatório das áreas dos picos

$A_{EI}$  = área do padrão interno (heptadecanoato de metila)

$C_{EI}$  = concentração do padrão interno (10 mg/mL)

$V_{EI}$  = volume do padrão interno (1 mL)

$m$  = massa de amostra (mg)

## 4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir dos experimentos estão dispostos abaixo.

### 4.1 Lipídeos totais

Os resultados do rendimento das análises do conteúdo lipídico total das amostras obtidos pelo método Bligh and Dyer (1959) estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento da extração de lipídeos totais de biomassa de *C. pyrenoidosa*

Marca	Lipídeos totais (%)
Green Gem	21,07 ± 0,00
Green Boost	16,88 ± 0,03

De acordo com Liu et al. (2011) a quantidade total de lipídeos na biomassa seca de *C. pyrenoidosa* pode variar entre 16 a 51 % dependendo da forma de cultivo, portanto os resultados se mostraram dentro do esperado para essa espécie de microalga.

O método Bligh and Dyer (1959) maximizou o rendimento da operação de extração, porém ao custo da utilização de dois solventes altamente tóxicos, clorofórmio e metanol. A utilização de microalgas em escala industrial está diretamente ligada ao desenvolvimento de métodos de extração ambiental e economicamente viáveis, porém no caso deste trabalho visou-se verificar a quantidade máxima de lipídeo presente com o objetivo de obter massa suficiente para realização dos experimentos posteriores.

### 4.2 Determinação do perfil de ácidos graxos

A partir dos resultados cromatográficos (Figura 9) foi possível calcular através da integração das áreas dos picos em tempos de retenção identificados para cada ácido graxo, dispondo os valores na Tabela 4.

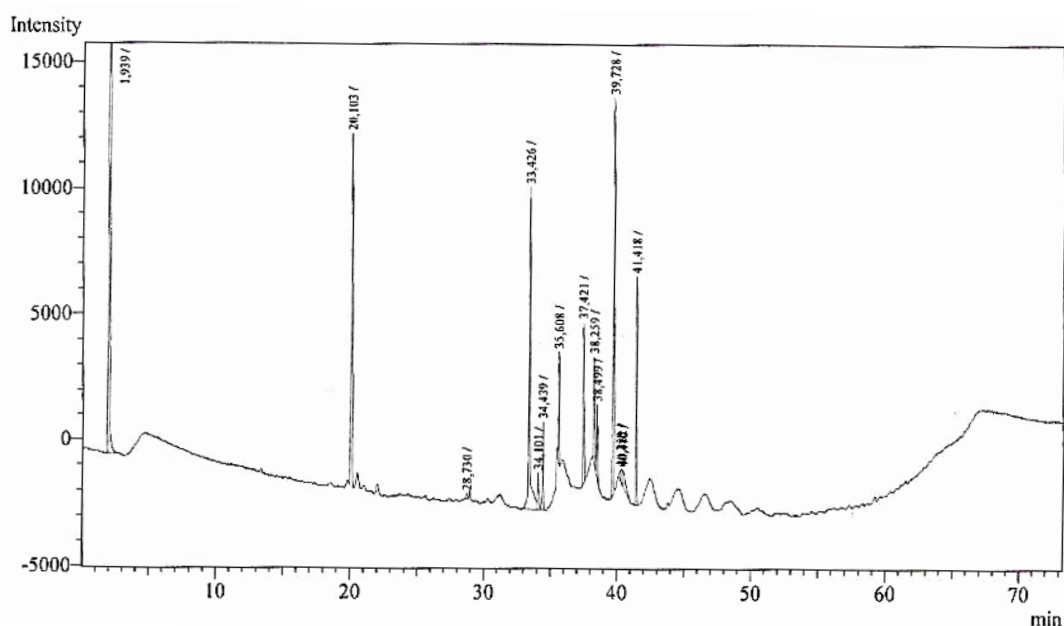


Figura 9. Cromatograma dos ácidos graxos presentes no óleo extraído de *C. pyrenoidosa*. Identificação C14:0 (28,73 min), C16:0 (33,43 min), C16:1 (34,10 min), C17:0 (34,44 min), C18:1 (38,26 e 38,50), C18:2 (35,61 e 39,73 min), C18:3 (37,42 min e 40,35 min), C20:4 (41,42 min).

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos na biomassa de *C. pyrenoidosa* e obtido da literatura

Ácido Graxo (% massa de óleo)	C14:0 Mirístico	C16:0 Palmítico	C16:1 Palmitoléico	C17:0 Margárico	C18:1 Oleico	C18:2 Linólico	C18:3 Linolelaídico	C 20:4 Araquidônico
Experimental	1	22	2	5	17	26	17	10
PETKOV et al. (2007)	1±0,5	22±6	5±2	0	12±2	21±4	18±2	0

O perfil dos ácidos graxos indica a presença majoritária de ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolelaídico (C18:3), usualmente encontrados em microalgas da espécie *Chlorella pyrenoidosa* (PETKOV et al, 2007).

A baixa quantidade de ácido mirístico (C14:0), 1 % na amostra, indica que a microalga foi cultivada em água doce, quando o meio de cultivo contém sal marinho a porcentagem desse ácido pode alcançar até 10 % da fração mássica de óleo (BEN-AMOTZ et al., 1985). A presença de ácido linolelaídico (C18:3) indica que a biomassa foi proveniente de uma cultura mista de algas verdes (MURAKAMI et al., 1997).

Além destes também foram encontrados ácidos graxos incomuns para a espécie *C. pyrenoidosa* como o ácido margárico (C17:0), evidenciando uma possível contaminação bacteriana da amostra (DEMORT et al., 1972) e o ácido araquidônico (C20:4) que autores

como Seto et al. (1984) e Yongmanitchai e Ward (1991) alegam ser comum na espécie *Chlorella minutissima*.

O óleo dessa amostra de *C. pyrenoidosa* apresenta uma fração mássica elevada de ácidos graxos poli-insaturados, o que proporciona ao biodiesel formado baixa resistência à oxidação, dificultando seu armazenamento e transporte.

A massa molar média do óleo foi estimada em 277,1 g/mol levando em conta a composição dos ácidos graxos.

### 4.3 Reação de transesterificação por via enzimática

Na análise dos resultados cromatográficos (Figura 10), verifica-se que foi possível produzir ésteres butílicos a partir de óleo extraído de microalga *C. pyrenoidosa*.

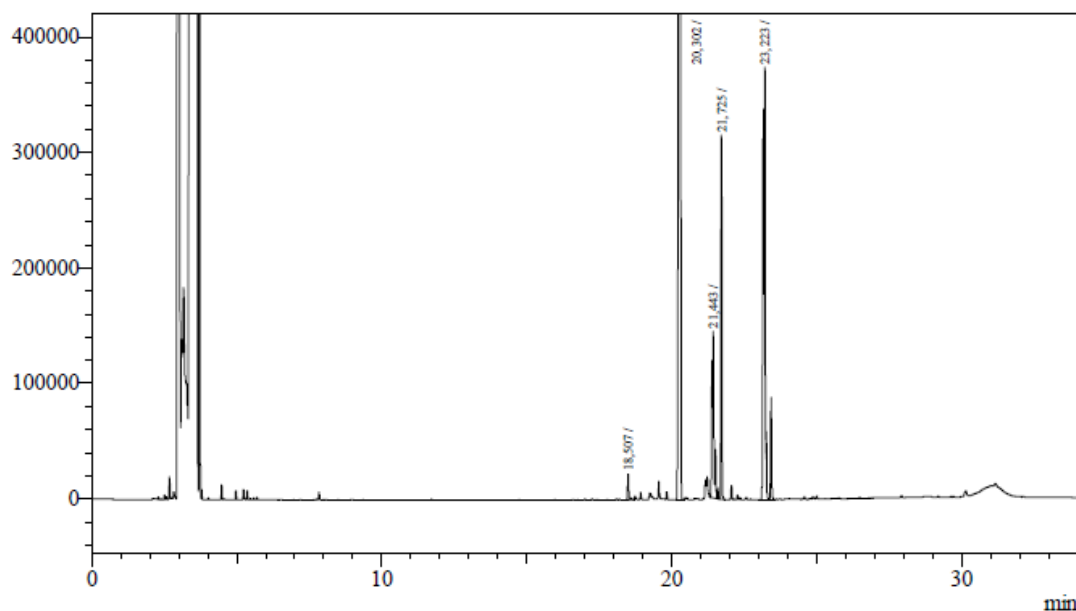


Figura 10. Cromatograma dos ésteres butílicos formados a partir do óleo de *Chlorella pyrenoidosa* por transesterificação por catálise enzimática com proporção álcool/óleo 10:1. Identificação: C16:0 (18,50 min), C17:0-Padrão (20,30 min), C18:1 (21,44 min), C18:2 e C18:3 (21,72 min), C20:4 (23,22 min).

Os ésteres identificados coincidem com os resultados do perfil de ácidos graxos, revelando que os que estão em maior proporção no óleo (C16:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:4) foram efetivamente convertidos em ésteres butílicos.

A proporção álcool/óleo é um parâmetro de alta relevância na reação de transesterificação por catálise enzimática. Necessita-se um excesso de álcool de maneira a deslocar o equilíbrio da reação em função da síntese de ésteres e para minimizar as limitações de difusão. Entretanto, níveis excessivos de álcool podem inibir a atividade da enzima e assim diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação de transesterificação

(RODRIGUES, 2009). De acordo com Yu et al., 2007, quantidades muito elevadas de álcool tendem a formar uma camada na superfície da enzima que bloqueia o acesso do substrato ao sítio ativo, inibindo ou até mesmo desnaturando a enzima. No presente trabalho, verificou-se que o máximo de rendimento de biodiesel foi obtido na proporção molar álcool/óleo de 10:1. Em proporções superiores de álcool, houve a redução do rendimento, o que está diretamente relacionado com a redução na atividade enzimática do biocatalisador causada pelo n-butanol em excesso.

Os resultados de rendimento variaram de 2,9 a 6,2 % de ésteres butílicos formados nas primeiras 6 h de reação e 3,4 a 10,1 % após 18 h. Os resultados estão dispostos na Figura 11.

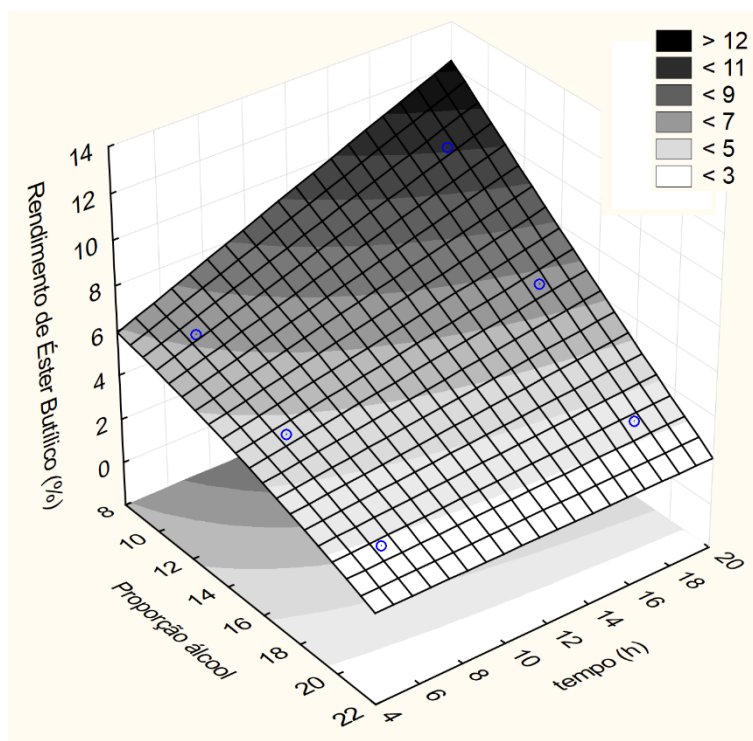


Figura 11. Resultados de rendimento da produção de ésteres butílicos (biodiesel) sob diferentes condições de proporção álcool/óleo no meio reacional e tempo de reação

O rendimento da produção de ésteres butílicos foi baixo, se comparado com os trabalhos de Rodrigues (2009), Lai et al. (2012) e Tran et al. (2012). Verificou-se, portanto, que a utilização de n-butanol e o biocatalisador Lypozime IM-RM não se mostrou adequada para o objetivo de obter um alto rendimento de reação para a produção de FABE's a partir do óleo extraído dessa espécie de microalga.

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Foi possível verificar através dos resultados que houve produção de ésteres butílicos a partir do óleo extraído dessa amostra de microalga. Porém, para utilizar esse tipo de matéria-prima para produção de biodiesel em escala industrial ainda necessita-se desenvolver tecnologias que possibilitem uma extração efetiva, barata e ecologicamente correta do óleo. Além disso, devem-se otimizar os parâmetros da reação de forma a obter altos rendimentos de produção de ésteres.

O avanço da biotecnologia pode proporcionar um melhor aproveitamento de recursos minimizando os efeitos ao meio ambiente. O estudo demonstrou a viabilidade da utilização da transesterificação por catálise enzimática, que possui como principal vantagem a redução de efluentes presentes no processo catalisado por via química, utilizando álcool butílico, proveniente de um processo fermentativo, para produzir um combustível a partir de matéria-prima renovável.

Para trabalhos futuros, sugere-se a utilização de uma espécie de microalga que apresente um perfil de ácidos graxos mais adequado para produção de biodiesel de alta qualidade, visto que o óleo de *Chlorella pyrenoidosa* apresenta um perfil com uma grande porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados, o que reduz a qualidade do biodiesel produzido. Devem ser testados também outros tipos de álcool na reação, como etanol e propanol, além de outros tipos de derivados enzimáticos.



## 6 Referências

Agência Nacional do Petróleo (2015). **"Boletim Mensal do Biodiesel – Março de 2015."** Disponível em: < [www.anp.gov.br/?dw=74913](http://www.anp.gov.br/?dw=74913) >

Araujo, G.S., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L. (2013). **"Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method."** Ultrasonics Sonochemistry 20: 95-98.

Ben-Amotz A., Tornabene, T.G., Thomas, W.H. (1985). **"Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids"**. J. Phycol 21: 72-81.

Brasil (2014). **"Lei nº 11.097"**. Diário Oficial da União. Disponível em < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm) >

Brennan, L., Owende, P. (2010). **"Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products."** Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 557-577.

Bligh, E. G., Dyer, W. J (1959). **"A rapid method of total lipid extraction and purification."** Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37(8): 911-917.

Chagas, A. L. (2014) **"Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga Dunaliella tertiolecta utilizando CO2 de fermentação de cerveja"**. UFRGS, 79 f.

Chisti, Y. (2007). **"Biodiesel from microalgae."** Biotechnology Advances 25: 294–306.

Chisti, Y. (2008). **"Biodiesel from microalgae beats bioethanol."** Trends in Biotechnology 26(3): 126-131.

De Castro M.D., Ayuso L.E. (2000). **"Environmental Applications / Soxhlet extraction"**. Encyclopedia of Separation Science. Level III - Practical Applications: 2701–2709.

DeMort, C.L., Lowry, R., Tinsley, I., Phinney, H.K. (1972). **"The biochemical analysis of some estuarine phytoplankton species. I. Fatty acid composition"**. J. Phycol 8: 211-216.

Demirbas, A. (2009). **"Progress and recent trends in biodiesel fuels."** Energy Conversion and Management 50: 14–34

D'Oca, M.G.M, Viêgas, C.V., Lemoes, J.S., Miyasaki E. K., Morón-Villarreyes J.A., Primel E. G., Abreu, P. C. (2011). **"Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the Chlorella pyrenoidosa."** Biomass and Bioenergy 35: 1533-1538.

EIA - U.S. Energy Information Administration (2013). **"Internacional Energy Outlook."** Disponível em: < [http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484\(2013\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484(2013).pdf) >

EIA - U.S. Energy Information Administration (2014). **"World Energy Outlook."** Disponível em: < [www.eia.gov/forecasts/aeo/pdf/0383\(2014\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/aeo/pdf/0383(2014).pdf) >

Guldhe A., B. S., Ismail Rawat, Kugen Permaul, Faizal Bux (2015). "**Biocatalytic conversion of lipids from microalgae *Scenedesmus obliquus* to biodiesel using *Pseudomonas fluorescens* lipase.**" *Fuel* 147: 117-124.

Halim R., M. D., Paul Webley (2012). "**Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review.**" *Biotechnology Advances* 30: 709–732.

Herman, A. S. **Biomedical Applications of Gas Chromatography**. New York: Plenum Press, 1964

Huang, J. X., Jiang, W., Ying, Li, Jilun, Li (2015). "**Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase.**" *Bioresource Technology* 180: 47-53.

Lai J., Z.-L. H., Roger A. Sheldon, Zhen Yang (2012). "**Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production.**" *Process Biochemistry* 47: 2058–2063

Lam, M.K, Lee, K.T. (2013) "**Catalytic transesterification of high viscosity crude microalgae lipid to biodiesel: Effect of co-solvent**". *Fuel Processing Technology* 110: 242–248

Lobo I., S. F., Cruz. R. (2009). "**Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos.**" *Química Nova* 32(6): 1596-1608.

Liu An-yue, W. C., Ling-ling Zheng, Li-rong Song (2011). "**Identification of high-lipid producers for biodiesel production from forty-three green algal isolates in China.**" *Progress in Natural Science: Materials International* 21: 269–276.

Mata T. M, A. A. M., N. S. Caetano (2010). "**Microalgae for biodiesel production and other applications - A review.**" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232.

Mohr, S.H. , J. W., G. Ellem , J. Ward , D. Giurco (2014). "**Projection of world fossil fuels by country.**" *Fuel* 141: 120-135.

Murakami, C., Takahashi, J., Shimpo, K., Maruyama, T., Niiya, I. (1997). "**Lipids and fatty acid composition of *Chlorella***". *Nihon Yukagakkaiishi* 46: 423-427

Petkov G., G. Garcia (2007). "**Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*?**" *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 281-285

Rashid, N., M. S. U. R., Madeha Sadiq, Tariq Mahmood, Jong-In Han (2014). "**Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production.**" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40: 760-778.

Rodrigues, R.C., Ayub, M.A. Z., Fernandez-Lafuente, R. (2009). "**Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente montipontual**". UFRGS, 183 f.

Sadeghinezhada E., S. N. K., A. Badarudina, C.S. Oona, M.N.M. Zubira, Mohammad Mehralib (2013). "**A comprehensive review of bio-diesel as alternative fuel for compression ignition engines.**" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 410: 410-424.

Seto A., Wang, H.L., Hesseltine, C.W. (1984). **“Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*.”** J. Am. Oil Chem.Soc. 61: 892-894.

Shahir V. K. , C. P. J., P.R. Sureshc (2015). **“Comparative study of diesel and biodiesel on CI engine with emphasis to emissions—A review.”** Renewable and Sustainable Energy Reviews 45: 686-697.

Tran, D.-T., B.-H. L., Duu-Jong Lee, Ching-Lung Chen, Hsiang-Yu Wang, Jo-Shu Chang (2013). **“Microalgae harvesting and subsequent biodiesel conversion.”** Bioresource Technology 140: 179-186.

Tran, D.-T., K.-L. Y., Ching-Lung Chen, Jo-Shu Chang (2012). **“Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia lipase*.”** Bioresource Technology 108: 119-127.

Vyas, A. P., J. L. V., N. Subrahmanyam (2010). **“A review on FAME production processes.”** Fuel 89: 1-9.

Yongmanitchai, W., Ward, O.P. (1991). **“Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid.”** Phytochemistry 30: 2963-2967.

Yang, L., Tan X., Li D., Chu, H., Zhou, X., Zhang Y, Yu, H.. (2015). **“Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater.”** Bioresource Technology 181: 54–61

Yu, D., Wang Z., Zhao L., Cheng Y, Cao S. (2007). **“Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas sp.* Lipase.”** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 48: 64–69

Wong, M.H. (1981). **“Chicken manure and blood waste for growing *Chlorella pyrenoidosa*”** Conservation & Recycling 4: 9-14.

Wu, H., Miao, X. (2014). **“Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels.”** Bioresource Technology 170: 421–427.

Zhao X., F. Q., Chongli Yuan, Wei Du, Dehua Liu (2015). **“Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization.”** Renewable and Sustainable Energy Reviews 44: 182–197.