

Artigo

Estudo da Utilização da Biomassa de Cianobactérias como Matéria-Prima para a Síntese de Biodiesel Através da Reação de Esterificação *In Situ*

Elicker, C.;* Flores, C. P.; Santos, M. A. Z.; Colepicolo, P.; Pereira, C. M. P.

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (6), 2497-2508. Data de publicação na Web: 6 de setembro de 2015

<http://www.uff.br/rvq>

Study of the Use of Cyanobacterial Biomass as Feedstock for Synthesis of Biodiesel Through In Situ Esterification Reaction

Abstract: In recent years was an increasing interest in the use of microalgae for biofuels, especially biodiesel, from previous extraction and subsequent transesterification of fatty acids present in the biomass of cyanobacteria. However, this is a time consuming and expensive process, which presents low productivity. Currently, this method has been successfully replaced by *in situ* esterification. This approach combines extraction and esterification of lipids in a single step, simplifying the process required for biodiesel production from microalgae biomass. In this work, biodiesel synthesis was performed using as feedstock biomass of cyanobacteria *Phormidium sp.*, *Pseudanabaena sp.* and mixed culture *Synechococcus sp.* and *Aphanocapsa sp.* Biodiesel derived of cyanobacteria biomass showed 42-51% of saturated fatty acids, 33-46% of monounsaturated fatty acids and 4-16% of polyunsaturated fatty acids, proving to be a potentially viable technique for production in larger scales.

Keywords: Fatty acids; biodiesel; cyanobacteria; gas chromatography.

Resumo

Nos últimos anos houve um crescente aumento no interesse pela utilização de microalgas para produção de biocombustíveis, especialmente biodiesel, a partir da prévia extração e subsequente transesterificação dos ácidos graxos presentes na biomassa de cianobactérias. Entretanto, este é um método demorado, caro e que apresenta baixa produtividade. Atualmente este método vem sendo substituído com sucesso pela esterificação *in situ*. Esta abordagem combina a extração e esterificação de lipídeos em um único passo, simplificando o processo necessário para a produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas. Neste trabalho, a síntese de biodiesel foi realizada empregando como matéria-prima a biomassa das cianobactérias *Aphanothece sp.*, *Phormidium sp.*, *Pseudanabaena sp.* e a cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* O biodiesel derivado da biomassa das cianobactérias apresentou de 42-51% de ácidos graxos saturados, 33-46% de ácidos graxos monoinsaturados e 4-16% de ácidos graxos poli-insaturados, mostrando-se uma técnica potencialmente viável para produção em maiores escalas.

Palavras-chave: Ácidos graxos; biodiesel; cianobactérias; cromatografia gasosa.

* Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Campus Universitário Anglo, nº 1, CEP 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

✉ carolinaelicker@yahoo.com.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150149](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150149)

Estudo da Utilização da Biomassa de Cianobactérias como Matéria-Prima para a Síntese de Biodiesel Através da Reação de Esterificação *In Situ*

Carolina Elicker,^{a,*} Chayane P. Flores,^b Marco Aurélio Z. dos Santos,^b Pio Colepicolo Neto,^c Claudio M. P. de Pereira^{a,b}

^a Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, CEP 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

^b Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, CEP 96160-000, Capão do Leão-RS, Brasil.

^c Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.

* carolinaelicker@yahoo.com.br

Recebido em 3 de junho de 2015. Aceito para publicação em 2 de setembro de 2015

1. Introdução

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

2.2. Conteúdo lipídico total

2.3. Síntese de biodiesel

3. Resultados e discussão

4. Conclusões

1. Introdução

O biodiesel é um proeminente substituto ao diesel convencional em função de ser considerado um combustível renovável, não-tóxico e biodegradável. Este biocombustível consiste de uma mistura de alquil ésteres de ácidos graxos usualmente produzidos a partir de matérias-primas renováveis.^{1,2} As microalgas e cianobactérias tem sido consideradas como uma das matérias-primas

mais promissoras para a produção de biodiesel em função de seu curto ciclo celular (alta taxa de crescimento), alto teor de óleo e forte capacidade de adaptação ao meio ambiente (alta salinidade, presença de íons de metais pesados e outros compostos tóxicos, alta concentração de CO₂, etc.). Isto permite seu cultivo em terras inexploradas, o que apresenta como vantagem a não ocupação de áreas aráveis.³⁻⁵ Nos últimos anos, devido aos avanços na pesquisa, cianobactérias foram ganhando atenção por sua potencial aplicação em biotecnologia.⁶

Cianobactérias são organismos primitivos e muito diversos com algumas características de bactérias e outras de algas. São similares as algas no tamanho e também são pigmentadas e realizam fotossíntese. No entanto, são organismos procariontes e portanto constituem um grande grupo dentro do reino *Bacteria* capaz de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio.⁷ Reconhece-se a existência de 150 gêneros e 2000 espécies deste tipo de organismo na natureza,⁸ entretanto especula-se que essas estimativas sejam conservadoras.

As cianobactérias podem ocorrer como células solitárias (frequentemente cocóides), em filamentos, agregações e colônias. São comuns em virtualmente todos os ambientes aquáticos (dulciaquícolas, estuarinos e marinhos) e ambientes terrestres úmidos; são ubíquas, mas tendem a ocorrer em maior biomassa em ambientes de água doce, como lagos, e mesmo em ambientes artificiais, como reservatórios. Espécies do gênero *Synechococcus* (células cocóides), por exemplo, são capazes de tolerar temperaturas de até 74 °C, ao passo que espécies do gênero *Phormidium* (filamentosa) formam biofilmes no fundo de lagos antárticos permanentemente cobertos por gelo, com reduzida penetração de luz mesmo no verão.⁹

A extraordinária capacidade de adaptação destes seres a diversas condições ambientais é devida possivelmente a sua condição procarionte e à simplicidade de suas células.⁹ Esta característica permite que as cianobactérias possam ser exploradas comercialmente. A síntese de lipídeos e ácidos graxos sob condições ambientais adequadas de temperatura, luminosidade, pH e disponibilidade de nutrientes, tornam as cianobactérias uma excelente fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.¹⁰

Atualmente biodiesel de microalgas e cianobactérias é produzido principalmente por via convencional, através da extração de ácidos graxos da biomassa seguida de conversão dos triglicerídeos a ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e

glicerol.^{11,12} Tal método é demorado, caro e difícil de ser aplicado, uma vez que necessita a quebra das rígidas paredes celulares das algas.⁴ Recentemente, o método de esterificação/transesterificação *in situ*, no qual a biomassa algal é posta diretamente em contato com álcool e catalisador, tem recebido muita atenção para a produção de biodiesel à base de algas.¹³ Este método tem mostrado aumento no rendimento de biodiesel produzido a partir de vários tecidos de plantas e animais em comparação com a abordagem tradicional.¹⁴

O processo de produção de biodiesel de microalgas em uma etapa já foi reportado anteriormente para algumas espécies tais como *Schizochytrium limacinum*,⁴ *Chlorella sp.*,¹⁵ *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris*,¹⁶ empregando aquecimento e agitação. Entretanto, rotas alternativas para síntese de biodiesel em uma etapa vêm crescendo nos últimos anos por possuírem vantagens tais como economia de reagentes e menores tempos reacionais.

A literatura reporta o uso de micro-ondas e ondas ultrassônicas na esterificação de lipídeos diretamente da biomassa de microalgas tais como *Tetraselmis suecica*, *Neochloris oleoabundans*, *Chlorella sorokiniana*, *Synechocystis sp.*, *Synechococcus elongates*, *Chaetoceros gracilis*¹⁷ e *Nannochloropsis sp.*,¹⁸ dentre outras. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou diversas rotas para esterificação de ácidos graxos empregando sonoquímica,¹⁹⁻²¹ incluindo a esterificação *in situ* da biomassa da microalga clorófitas *Chlorella vulgaris*.²²

Muito embora existam trabalhos reportados na literatura a respeito da síntese de biodiesel a partir de óleo de cianobactérias, não há estudos relativos à síntese deste biocombustível diretamente a partir da biomassa de cianobactérias empregando ultrassom. Neste trabalho, a síntese de biodiesel é realizada diretamente a partir de biomassa das cianobactérias *Phormidium sp.*, *Pseudanabaena sp.*, e de uma cultura mista de *Synechococcus sp.* e

Aphanocapsa sp. Estes gêneros são de ocorrência comum em ambientes aquáticos dulciaquícolas e terrestres úmidos, e facilmente acessíveis para o desenvolvimento de novas atividades econômicas. O objetivo deste trabalho é avaliar a composição do perfil de ácidos graxos dos biocombustíveis sintetizados.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As cepas das cianobactérias *Phormidium sp.*, *Pseudanabaena sp.*, *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas da Universidade Federal de São Paulo (USP). As cianobactérias foram cultivadas em meio de cultivo Braun-Grunow padrão (BGN_p), filtradas com auxílio de bomba a vácuo (Prismatec, 132B) e secas em estufa com circulação de ar (Marconi, MA035) a 25°C durante 72 horas. Posteriormente, foram trituradas manualmente com auxílio de almofariz e pistilo e acondicionadas para uso futuro.

2.2. Conteúdo lipídico total

O conteúdo lipídico total (L_{TOTALIS}) foi mensurado seguindo a metodologia proposta por Bligh e Dyer.²³ A quantificação se dá a partir da relação entre a quantidade de lipídeo extraído em 20 mL de clorofórmio, o volume de clorofórmio recuperado após a extração, e a massa total da amostra, conforme a Equação 1:

$$L_{\text{TOTALIS}}(\%) = \frac{P_{\text{AE}}}{\left(\frac{P_{\text{AB}} \times V_{\text{CR}}}{V_{\text{CI}}}\right)} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Equação 1, Conteúdo lipídico total. P_{AE} = peso de amostra extraída (g); P_{AB} = peso de amostra bruta (g); V_{CR} = volume de clorofórmio recuperado (mL); V_{CI} = volume de clorofórmio inicial utilizado (20 mL).

2.3. Síntese de biodiesel

A metodologia selecionada, empregando ultrassom como promotor do rompimento celular e da esterificação dos lipídeos, foi previamente descrita por Hobuss e colaboradores²² e está esquematizada na Figura 1.

Os procedimentos foram realizados em ultrassom (Sonics), com frequência total de 50/60 Hz, frequência ultrassônica de 20 kHz e amplitude de 30%. A biomassa seca das cianobactérias (1 g) foi misturada a 7 mL de metanol, 4 mL de clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico, a mistura reacional foi então sonicada por 30 min. Depois de completa a reação, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e foram adicionados 10 mL de Na_2SO_4 1,5%, misturando brevemente. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 3000 rpm (centrífuga Quimis, Q222T) para acelerar a separação de fases aquosa e orgânica. A fase orgânica (contendo biodiesel) foi coletada e transferida para um balão previamente pesado e evaporada em evaporador rotatório. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG, biodiesel) foram, então, determinados por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-FID).

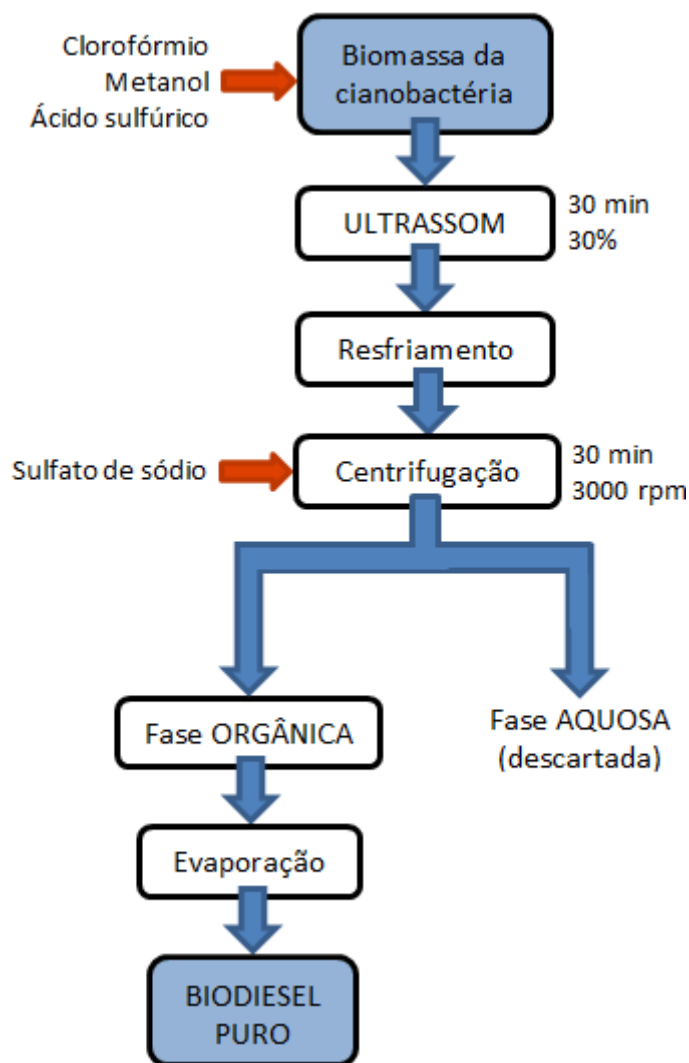


Figura 1. Esquema representativo do procedimento experimental adotado neste trabalho

2.3.1. Procedimentos cromatográficos

As amostras de biodiesel foram analisadas por Cromatografia Gasosa (CG-FID), em equipamento marca Shimadzu, modelo GC-2010, equipado com injetor split/splitless, detector por ionização em chama (FID), autoinjeter AOC-20i e coluna RTX-WAX 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Restek Corporation). As condições operacionais empregadas foram: hidrogênio como gás carreador (vazão 1,2 mL.min⁻¹); modo split (1:25); volume injetado de amostra 1 μ L; temperatura inicial do forno 100 $^{\circ}$ C, com rampa 7 $^{\circ}$ C.min⁻¹ até 200 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C.min⁻¹ até 202,6 $^{\circ}$ C (por um período de 2

min), 5 $^{\circ}$ C.min⁻¹ até 230 $^{\circ}$ C (estável em 10 min); temperatura do injetor e detector 250 $^{\circ}$ C; tempo total de corrida 34,29 min.

Os ácidos graxos foram identificados por comparação cromatográfica dos tempos de retenção com o padrão FAME Mix 37 (Sigma-Aldrich), sendo os resultados expressos em porcentagem do composto em biomassa seca. A porcentagem de conversão de ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (C_{EMAG}) foi calculada conforme determina a norma EN 14103,²⁴ utilizando padrão interno ácido heptadecanoico e heptano como solvente, através da Equação 2:

$$C_{EMAG}(\%) = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Equação 2, Conversão de ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos. ΣA = total da área de picos dos ésteres metílicos C14:0 a C24:1; A_{EI} = pico de área correspondente ao metil heptadecanoato; C_{EI} = concentração da solução de metil heptadecanoato utilizada (mg.L^{-1}); V_{EI} = volume da solução de metil heptadecanoato utilizada (mL); m = massa utilizada de amostra (mg).

3. Resultados e discussão

A quantificação do conteúdo lipídico total, conversão de ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e o perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido a partir da biomassa das cianobactérias *Phormidium sp.*, *Pseudanabaena sp.* e da cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* podem ser observados na Tabela 1. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foram realizadas a partir de seus picos correspondentes nos cromatogramas apresentados na Figura 2.

Phormidium sp. apresentou o menor conteúdo lipídico total (5,12%), seguido da cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* (8,17%) e *Pseudanabaena sp.* (10,98%). O teor de lipídeos totais determinado foi variável entre os gêneros e mesmo em comparação com a literatura²⁵⁻²⁷. Entretanto, deve-se considerar que esta característica é primariamente dependente do tipo de cianobactéria e das condições de cultivo empregadas,²⁸ tais como temperatura, luminosidade e disponibilidade de nutrientes. A percentagem de conversão de ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos alcançou valores baixos situados entre 11,3 – 14,7%.

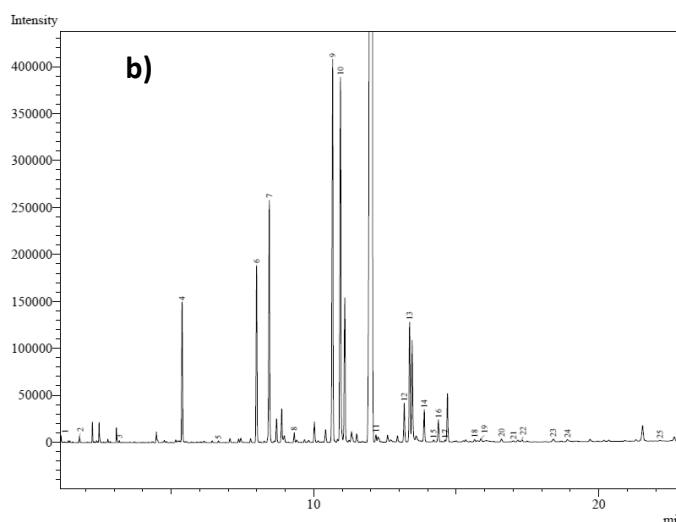
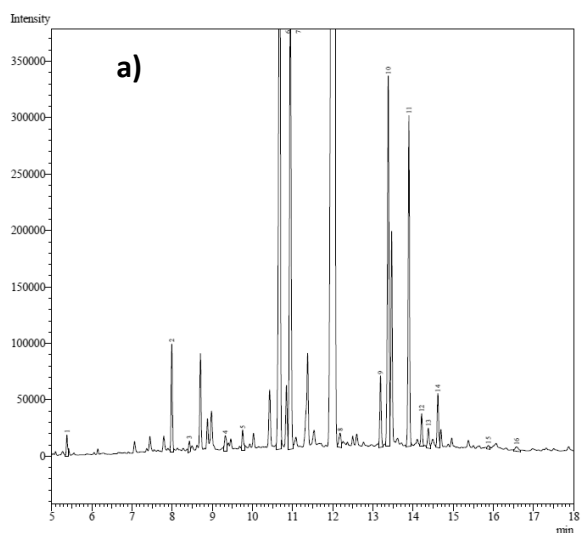
Pela análise da Figura 3, pode-se observar em (a) um gráfico que demonstra o perfil de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) obtido no biodiesel. Já analisando a Figura 3 (b), encontra-se o perfil dos principais ácidos graxos encontrados nas amostras de biodiesel derivado da biomassa das cianobactérias das diferentes culturas.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido por esterificação *in situ* dos lipídeos das cianobactérias estudadas

	<i>Phormidium sp.</i>	<i>Pseudanabaena sp.</i>	Cultura mista <i>Synechococcus sp.</i> e <i>Aphanocapsa sp.</i>
L_{TOTALS} (%)	5,12	10,98	8,17
C_{EMAG} (%)	14	11,3	14,7
Ácidos graxos saturados (AGS) (%)			
C6:0	ND	0,23	0,18
C8:0	ND	0,26	0,16
C10:0	ND	0,11	0,22
C12:0	0,69	7,11	0,86
C13:0	ND	0,17	0,12
C14:0	3,81	10,03	9,89
C15:0	0,80	0,65	0,81
C16:0	33,85	25,18	31,74
C18:0	2,88	2,67	4,40

C19:0	0,92	1,57	1,08
C20:0	ND	0,29	0,33
C21:0	ND	ND	0,24
C22:0	ND	0,50	0,58
C23:0	ND	ND	0,32
C24:0	ND	0,28	0,61
Σ_{AGS}	42,95	49,03	51,54
Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) (%)			
C14:1	0,44	14,29	1,28
C15:1	0,91	ND	ND
C16:1	21,96	23,16	23,56
C17:1	0,85	0,55	0,83
C18:1n9c	15,81	7,90	7,09
C20:1n9	0,20	0,39	0,59
C24:1n9	ND	ND	0,21
Σ_{AGMI}	40,17	46,29	33,55
Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (%)			
C18:2n6c	13,02	2,41	8,15
C18:3n3	2,18	0,23	1,32
C18:3n6	1,24	0,27	3,39
C20:2	0,44	0,47	0,59
C20:3n6	ND	0,35	0,30
C20:4n6	ND	0,38	0,71
C20:5n3	ND	0,58	0,47
Σ_{AGPI}	16,88	4,68	14,91
$\Sigma_{AGMI+AGPI}$	57,05	50,97	48,46

$L_{TOTALIS}$ = Lipídeos totais; C_{EMAG} = Conversão de AG a EMAG; ND = não detectado.



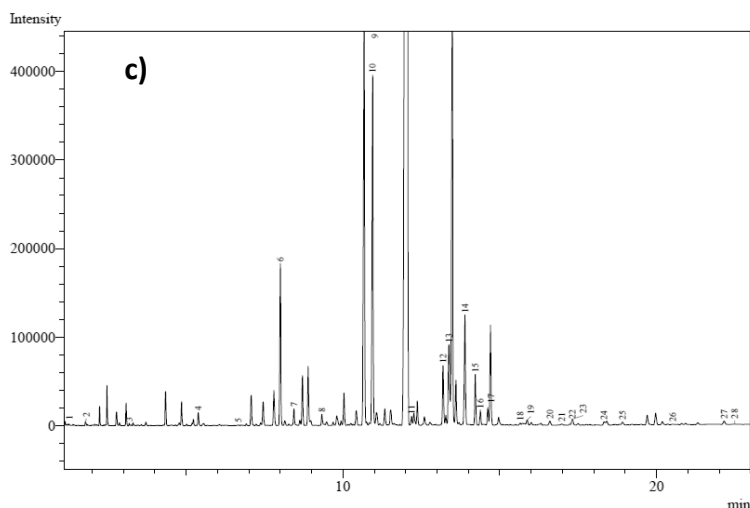


Figura 2. Cromatograma do biodiesel derivado de (a) *Phormidium sp.*; (b) *Pseudanabaena sp.* e (c) cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.*

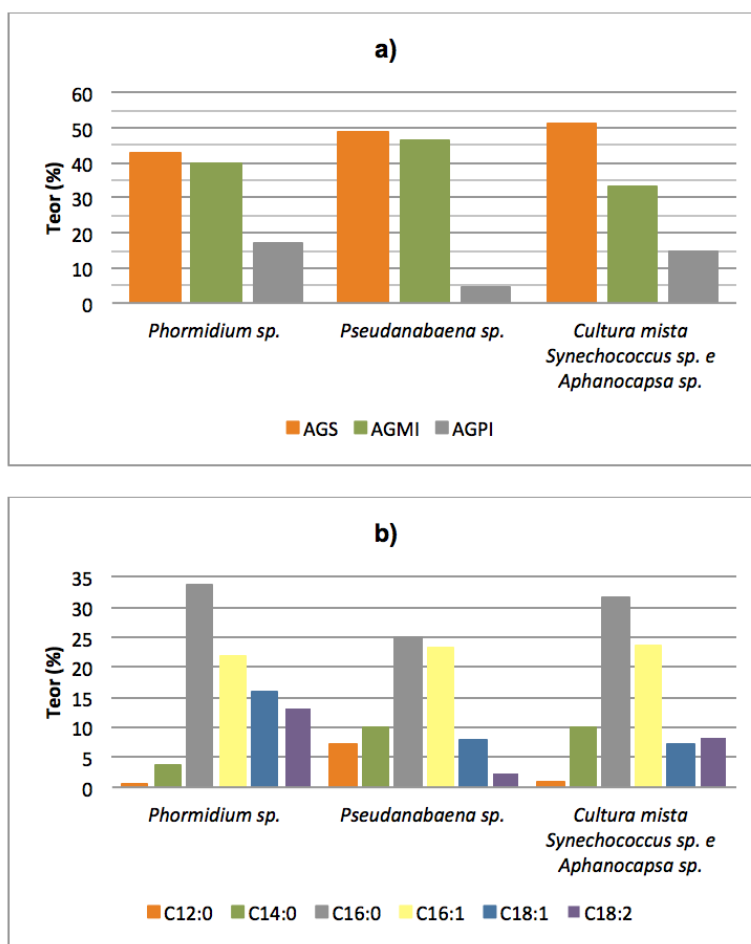


Figura 3. (a) Teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados presentes na amostra de biodiesel de diferentes culturas de cianobactérias e; (b) Principais ácidos graxos presentes no biodiesel sintetizado a partir da biomassa das cianobactérias objeto deste estudo

O biodiesel obtido a partir da biomassa de *Phormidium sp.* apresentou percentuais de AGS e AGMI semelhantes, sendo o ácido hexadecanóico (palmítico, C16:0) o encontrado em maior quantidade dentre os saturados e os ácidos hexadecenóico (palmitoleico, C16:1) e octadecenóico (oleico, C18:1) predominantes entre os monoinsaturados. A percentagem total de AGPI quantificada alcançou mais de 16%, a maior dentre as cianobactérias estudadas, principalmente devido à presença de ácido octadecadienóico (linoleico, C18:2).

Pseudanabaena sp. apresentou balanço entre AGS:AGMI semelhante. Ácidos hexadecanóico (palmítico, C16:0) e tetradecanóico (mirístico, C14:0) foram encontrados em maior quantidade dentre os saturados, e os ácidos hexadecenóico (palmitoleico, C16:1), tetradecenóico (C14:1) e octadecenóico (oleico, C18:1) foram os predominantes entre os monoinsaturados. Dentre os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), este gênero apresentou a menor quantidade total dentre todas as cianobactérias (4,68%), composto de baixos percentuais de diversos ácidos graxos onde predominou o ácido octadecadienóico (linoleico, C18:2).

A cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* apresentou predomínio de AGS (51,54%), a maior percentagem dentre as culturas abordadas, sendo os ácidos hexadecanóico (palmítico, C16:0) e tetradecanóico (mirístico, C14:0) encontrados em maior quantidade. Dentre os AGMI, os predominantes foram os ácidos hexadecenóico (palmitoleico, C16:1) e octadecenóico (oleico, C18:1). À semelhança de *Phormidium sp.*, a quantidade de AGPI foi alta, sendo o ácido octadecadienóico (linoleico, C18:2) o AGPI predominante.

Cabe salientar que todas as cianobactérias apresentam os três ácidos graxos considerados os principais em cianobactérias, conforme estudo de Sharathchandra e Rajashekhar:²⁹ ácido palmítico (C16:0) em teores variáveis entre 25% e 33%; ácido oleico (C18:1) em concentrações entre 7% e 15%; e ácido linoleico (C18:2) em

percentagens variáveis entre 2% e 13%. Adicionalmente, verificou-se expressiva presença de ácido palmitoleico (C16:1), em concentrações em torno de 20% em todas as cianobactérias estudadas, conforme pode ser visto na Tabela 1 e Figura 2 (b).

Através de especificações normativas determina-se que o biodiesel deve ser composto por ésteres de cadeias hidrocarbônicas entre C12 e C22,³⁰ sendo os teores de ácido linolênico (C18:3) limitados a no máximo 12% e poli-insaturados com quatro ou mais duplas ligações limitado ao máximo de 1%.³¹ *Phormidium sp.*, atende simultaneamente a todas estas especificações (100% dos ácidos graxos identificados tem entre 12 e 22 carbonos em suas cadeias; 3,42% de C18:3 e 0,0% de ácidos graxos com quatro ou mais insaturações), enquanto *Pseudanabaena sp.* possui pequenos teores de ácidos graxos com cadeias carbônicas maiores que C22 ou menores que C12 (0,68% e 0,88%, respectivamente). A cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* possui 1,49% do seu total de ácidos graxos compostos por cadeias maiores que C22 ou menores que C12, e 1,18% de ácidos graxos com quatro ou mais insaturações.

A composição de ácidos graxos do biodiesel influencia em algumas características físico-químicas deste biocombustível, tais como viscosidade e índice de iodo, e afeta diretamente a qualidade do produto. Ésteres monoalquílicos de ácidos graxos com cadeias hidrocarbônicas saturadas de C16 (palmítico) e C18 (esteárico) tem uma tendência maior a se solidificarem a baixa temperatura do que as cadeias de até 18 carbonos com uma ou mais insaturações. Desta forma, o biodiesel composto por cadeias saturadas pode se tornar impróprio para o uso em climas frios. Todavia, essa característica não elimina a possibilidade de uso dos ésteres com cadeias saturadas na produção de biodiesel, mas limita seu uso em forma pura ou em misturas

maiores que B20¹ apenas a climas tropicais.³² Em contrapartida, a presença de teores elevados de ácido linolênico (C18:3) ou ácidos graxos com quatro ou mais insaturações no óleo resultará em uma tendência muito elevada à oxidação,³³ o que pode levar a formação de compostos que tornariam o biodiesel impróprio. O uso de compostos monoinsaturados é considerado melhor para a produção do biodiesel,^{19,34,35} por resultar em um balanceamento adequado para este biocombustível.

A proporção AGS:AGMI:AGPI do biodiesel obtido nas amostras foram consideradas proeminentes para a produção de biodiesel. Todavia *Pseudanabaena sp.* apresenta o maior teor de AGMI (46,29%), seguido de *Phormidium sp.* (40,17%) e da cultura mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.* (33,55%). *Phormidium sp.* e a cultura mista (mista *Synechococcus sp.* e *Aphanocapsa sp.*) apresentam maiores teores de poli-insaturados (16,88% e 14,61%, respectivamente), o que pode aumentar a viscosidade do biocombustível e ocasionar deposição de resíduos nas partes internas do motor.^{19,36} Adicionalmente, esta composição influenciar no índice de iodo, característica relacionada ao grau de instauração das cadeias que afeta diretamente na densidade, viscosidade e estabilidade oxidativa do biodiesel.^{19,37}

4. Conclusões

Todas as cianobactérias estudadas se mostraram fontes potenciais de matéria-prima para produção de biodiesel em larga escala. Todavia, *Pseudanabaena sp.* se destaca por possuir maior teor lipídico e apresentar maior teor de ácidos graxos monoinsaturados. Caracterizações físico-químicas complementares tais como determinação da viscosidade, estabilidade

oxidativa e índices de acidez, iodo e saponificação devem ser realizadas. O procedimento descrito neste trabalho pode ser considerado uma metodologia econômica e ambientalmente amigável para reações de esterificação com importância comercial, necessitando de otimização para o incremento das percentagens de conversão.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ¹ Dermibas, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management* **2010**, *51*, 2738. [CrossRef]
- ² Suganya, T.; Gandhi, N. N.; Renganathan, S. Production of algal biodiesel from marine macroalgae *Enteromorpha compressa* by two step process: Optimization and kinetic study. *Bioresource Technology* **2013**, *128*, 392. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **2007**, *25*, 294. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Johnson, M. B.; Wen, Z. Production of biodiesel fuel from de microalgae *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy and Fuels* **2009**, *23*, 5179. [CrossRef]
- ⁵ Pereira, C. M. P.; Hobuss, C. B.; Maciel, J. V.; Ferreira, L. R.; Del Pino, F. B.; Mesko, M. F.; Jacob-Lopes, E.; Colepicolo, P. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. *Química Nova* **2012**, *35*, 2013. [CrossRef]
- ⁶ Oliveira, W. C.; Oliveira, C. A.; Campos-Galvão, M. E. M.; Casto, V. C.; Nascimento, A. G. Cyanobacteria: A review of potential nutritional and biotechnological aspects. *Biochemistry and Biotechnology Reports* **2013**, *2*, 49. [CrossRef]

¹ Mistura diesel-biodiesel em que 20% do total corresponde a biodiesel.

- ⁷ Castenholz, R. W.; Waterbury, J. B. Em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Stanley, J. T., ed.; Williams & Wilkins: Baltimore, 1989, cap. 19.
- ⁸ van den Hoek, C.; Mann, D. G.; Jahns, H. M.; *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, 1995.
- ⁹ Lourenço, S. O.; *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. 1a. ed. RiMa: São Carlos, 2006.
- ¹⁰ Deng, X.; Li, Y.; Fei, X. Microalgae: a promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research* **2009**, *3*, 1008. [[Link](#)]
- ¹¹ Miao, X. L.; Wu, Q. Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* **2006**, *97*, 841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Xu, H.; Miao, X.; Wu, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* **2006**, *126*, 499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Li, P.; Miao, X.; Li, R.; Zhong, J. *In situ* biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, *2011*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Halim, R.; Danquah, M. K.; Webley, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Ehimen, E. A.; Sun, Z. F.; Carrington, C. G. Variables affecting the *in situ* transesterification of microalgae lipids. *Fuel* **2010**, *89*, 677. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Lohman, E. J.; Gardner, R. D.; Halverson, L.; Macur, R. E.; Brent, M. P.; Gerlach, R. An efficient and scalable extraction and quantification method for algal derived biofuel. *Journal of Microbiological Methods* **2013**, *94*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Wahlen, B. D.; Willis, R. M.; Seefeldt, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 2724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Koberg, M.; Cohen, M.; Ben-Amotz, A.; Gedanken, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 4265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Rockembach, C. T.; Dias, D.; Vieira, B. M.; Ritter, M.; dos Santos, M. A. Z.; de Oliveira, D. M.; Fontoura, L. A. M.; Crizel, M. G.; Mesko, M. F.; dos Santos, V. O.; C. M. P. Pereira. Síntese do Biodiesel Derivado do Óleo da Semente de Uva Promovida por Ultrassom. *Revista Virtual de Química* **2014**, *6*, 884. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Hobuss, C. B.; Venzke, D.; Pacheco, B. S.; Souza, A. O.; Santos, M. A. Z.; Moura, S.; Quina, F. H.; Fiametti, K. G.; Oliveira, J. V.; Pereira, C. M. P. Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. *Ultrasonics Sonochemistry* **2012**, *19*, 387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Pacheco, B. S.; Nunes, C. F.; Rockembach, C. T.; Bertelli, P.; Mesko, M. F.; Roesch-Ely, M.; Moura, S.; Pereira, C. M. P. Eco-friendly synthesis of esters under ultrasound with p-toluenesulfonic acid as catalyst. *Green Chemistry Letters and Reviews* **2014**, *7*, 265. [[CrossRef](#)]
- ²² Hobuss, C. B.; Rosales, P. F.; Venzke, D.; Souza, P. O.; Gobbi, P. C.; Gouvea, L. P.; Santos, M. A. Z.; Pinto, E.; Jacob-Lopes, E.; Pereira, C. M. P. Cultivation of algae in photobioreator and obtention of biodiesel. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 361. [[CrossRef](#)]
- ²³ Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, *37*, 911. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ EN14103:2003. Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. European Committee for Standardization: Brussels, 2003. [[Link](#)]
- ²⁵ Francisco, E. C.; Neves, D. B.; Jacob-Lopes, E.; Franco, T. T. Microalgae as a feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2010**, *85*, 395. [[CrossRef](#)]

- ²⁶ Queiroz, M. I.; Hornes, M. O.; Silva-Manetti, A. G.; Jacob-Lopes, E. Single cell oil production by *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy* **2011**, *88*, 3438. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Karatay, S. E.; Dönmez, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Applied Energy* **2011**, *88*, 3632. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Romano, I.; Bellitti, R.; Nicolaus, B.; Laman, C.; Pagnota, E.; Gambacorta, A. Lipid profile: A useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry* **2000**, *50*, 560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Sharathchandra, K.; Rajashekhar, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *Journal of Algae Biomass Utilization*, **2011**, *2*, 83. [[Link](#)]
- ³⁰ ASTM PS 121. Provisional Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuel. American Society for Testing and Materials. USA, 1999. [[Link](#)]
- ³¹ EN14214:2008. Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – Requirements and test methods. European Committee for Standardization: Brussels, 2008. [[Link](#)]
- ³² Dabdoub, M. J.; Bronzel, J. L.; Rampin, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, **2009**, *32*, 776. [[CrossRef](#)]
- ³³ Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology* **2005**, *86*, 1059 [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Stansel, G. R.; Gray, V.M.; Sym, S. D. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology* **2012**, *24*, 791. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Redel-Macías, M. D.; Pinzi, S.; Ruz, M. F.; Cubero-Atienza, A. J.; Dorado, M. P. Biodiesel from saturated and monounsaturated fatty acid methyl esters and their influence over noise and air pollution. *Fuel* **2012**, *97*, 751. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Lôbo, I. P.; Ferreira, S. L. C.; da Cruz, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova* **2009**, *32*, 1596. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Sendzikiene, E.; Makareviciene, V.; Janulis, P. Oxidation stability of biodiesel fuel produced from fatty wastes. *Polish Journal of Environmental Studies* **2005**, *14*, 335. [[Link](#)]