

Microalgas na Produção de Biodiesel: Extração e Composição Lipídica

Lucas Ferrari Granado Soares^{1,2,*}, Cristiane Mesquita da Silva Gorgônio²,
Donato Aranda²

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Botucatu

² Laboratório de Tecnologias Verdes, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

* Autor correspondente: lucas_ferrari@hotmail.com

Resumo: O contínuo aumento na emissão de gases de efeito estufa cedeu espaço para o uso de biocombustíveis, devido a políticas que focam em combustíveis seguros, limpos e renováveis. A utilização de microalgas para a produção de biodiesel tem sido descrita como uma das mais promissoras fontes de biomassa para biocombustíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a extração e o perfil lipídico das microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis gracilis*. As extrações foram realizadas com os solventes clorofórmio/metanol e éter de petróleo. O perfil lipídico foi analisado em cromatógrafo gasoso após transesterificação. O éter de petróleo mostrou-se mais eficiente nas extrações, sendo o melhor resultado obtido na microalga *D. tertiolecta* com 19,52% de lipídio. A análise do perfil lipídico indicou um biodiesel estável à oxidação e viscosidade elevada.

Palavras chave: Biodiesel; Microalga; Extração; Lipídeo.

Abstract: The uninterrupted rise in emission of greenhouse gases open way to the use of biofuels, due to politics that focus on fuel safe, clean and renewable. The use of microalgae for biodiesel production has been described as one of the most promising sources of biomass for biofuels. The aim of this study was to evaluate the extraction and lipid profile of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis*. The extractions were performed with solvents chloroform /methanol and petroleum ether. The lipid profile was analyzed by gas chromatography after transesterification. The petroleum ether showed more efficiency in the extraction, the best result obtained was in the microalgae *D. tertiolecta* with 19.52% of lipid. The lipid profile analysis indicated a biodiesel stable to oxidation and elevated viscosity.

Keywords: Biodiesel; Microalgae; Extraction; Lipid

1. Introdução

A emissão de gases do efeito estufa (GEE) deve aumentar ainda mais nos próximos anos, devido à ampla demanda de energia nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Essa energia é derivada principalmente da queima de combustíveis fósseis que levam a profundos efeitos no aquecimento global. Confirmando a importância da implementação do uso de energias renováveis e do sequestro de carbono (Skjanes *et al.*, 2007). O uso de biocombustíveis líquidos no setor de transporte aumentou rapidamente em nível mundial, dirigido pelas políticas que focam combustíveis seguros, limpos e livres da emissão de GEE (World Energy Outlook, 2007). O biodiesel recebeu grande atenção pelas

suas características não tóxicas, biodegradáveis e renovável, uma vez que seu uso proporciona benefícios ambientais quando comparado ao diesel de origem fóssil. (Vicent *et al.*, 2004).

Para a produção de biodiesel mundial, diversas fontes renováveis vêm sendo escolhidas, incluindo óleos vegetais, gorduras animais e óleos usados. No Brasil as principais matérias-primas usadas são soja e sebo. No entanto, oleaginosas, como a soja, necessitam de grande quantidade de energia e área cultivada para a produção suficiente de óleo. Da mesma forma, a gordura animal precisa de alimentação e área para criação destes animais. Nesse sentido, microorganismos têm sido freqüentemente considerados para a produção de óleos e gorduras como uma

alternativa à origem agrícola e animal (Meng *et al.*, 2008).

Microalgas são seres fotossintetizantes ubíquos em sistemas aquáticos, envolvendo enorme diversidade de formas e funções ecológicas, sendo também aproveitadas em atividades econômicas (Campos *et al.*, 2010). A utilização de microalgas para a produção de biodiesel tem sido descrita como uma das mais promissoras fontes de biomassa, com potencial para cumprir as metas de substituição do diesel de petróleo, sem interferir em terra arável adequada para a produção de alimentos (Lee *et al.*, 2010). Estas destacam-se por serem fontes contínuas e rápidas de óleo, que pode ultrapassar em dez vezes a produção das oleaginosas (Schenk *et al.*, 2008), crescem em meio aquoso, porém, necessitam de menos água do que a agricultura, podem ser cultivadas em água de reuso, salobra e em áreas não cultiváveis para alimentos. O cultivo de microalgas contribui para o sequestro de carbono (1 kg de biomassa seca de microalga utiliza 1,83 kg de CO₂) e não utiliza pesticidas nem herbicidas. Os subprodutos após a extração de óleo podem ser usados como alimento, fertilizantes (Brennan *et al.*, 2009) ou na indústria farmacêutica (D'Oca *et al.*, 2008).

Os principais processos envolvidos na produção de biodiesel utilizando microalgas são o cultivo, a extração e a transesterificação dos lipídeos (Lee *et al.*, 2010). O cultivo pode influenciar na produção de lipídios e ácidos graxos por fatores como intensidade luminosa, temperatura e nutrientes (Costa *et al.*, 2006). O custo da matéria-prima do biodiesel a partir de microalga é de 60% a 75% do produto final (Huang *et al.*, 2010). Logo, uma extração eficiente é fundamental para a competitividade do biocombustível, uma vez que este biodiesel ainda não é comercializado

em larga escala devido ao alto custo de produção (Johnson *et al.*, 2010). A transesterificação consiste em reagir triacilglicerídeos com álcoois de cadeia curta a fim de produzir ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, originando ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) ou ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs), conforme álcool utilizado (Meng *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência extrativa a partir de solventes orgânicos, os lipídeos totais e o perfil de ésteres metílicos obtidos a partir do óleo extraído de três espécies de microalgas marinhas para a produção de biodiesel.

2. Material e Métodos

2.1 Microalgas

Neste estudo foram utilizadas três espécies de microalgas marinhas flageladas: *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae), *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae) e *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). As microalgas marinhas foram coletadas junto ao projeto POMAR (IED-BIG) conveniado a Petrobras, localizado em Angra dos Reis (RJ), onde são cultivadas em condições controladas de cultivo.

As microalgas foram cultivadas em garrafas transparentes de polipropileno com capacidade para 20L em meio de cultivo *Guillard / F2 modificado* (Guillard, 1975), por 8 dias. Estes foram mantidos em fotoperíodo de 24h, com a utilização de 4 lâmpadas frias de 40 watts, temperatura de 20°C (± 2°C) e aeração com ar comprimido filtrado. O controle de pH do meio foi mantido, em equilíbrio de 7 a 8, com o auxílio da solução de TRIS (2-amino-2-{hidroximetil}-1-3-propanediol).

2.2 Determinação dos Lipídios Totais

Para realizar a análise quantitativa de lipídeos foram utilizados 0,5g de células, em peso seco, das três microalgas, em triplicata. A massa de amostra utilizada na análise foi estimada a partir da massa seca de células, obtida a partir de filtração à vácuo. Para a extração dos lipídeos totais usou-se dois métodos, (a) clorofórmio/metanol e (b) éter de petróleo constituído de duas etapas, extração de lipídeos totais e remoção de sais. O teor de lipídeos foi determinado por gravimetria.

2.2.1 Extração de lipídeos totais

(a) Foram adicionados a amostra 40mL de solução (2:1) de clorofórmio/metanol (Folch, *et al.* 1956), ambos da marca Tedia. Os tubos fechados foram agitados em vortex à 1400rpm por 20min, deixados em repouso durante 30 min e submetidos à nova agitação por 20min. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 3000rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, foi recolhida a fase líquida da amostra que foi levado à estufa à 40°C para evaporação dos solventes.

(b) Foi usado o método de extração por Soxhlet (Figura 1), segundo Instituto Adolfo Lutz, 2005. A amostra foi colocada em cartucho de celulose e este em extrator de Soxhlet com 200mL de éter de petróleo, da marca Vetec, acoplado acima a um condensador tipo bola e abaixo a um balão de fundo chato de 250mL. O experimento foi mantido sob aquecimento contínuo em placa de aquecimento da marca Fisaton, durante 6 horas. Após o tempo de extração, o éter foi recuperado por destilação simples, até restar no balão um volume próximo de 10mL.

Figura 1 – Extração por Soxhlet



2.2.2 Remoção de Sais

(a) A amostra foi adicionado uma mistura de água destilada:hexano (1:1). A amostra foi agitada vigorosamente e submetida à nova centrifugação (3000rpm/15min) para assegurar a remoção do sal e de outros resíduos. Da amostra, com duas fases, foi recolhida a fase superior que foi colocada, com o auxílio de uma pipeta automática, em béquer, que foi pesado até peso constante. O quantitativo lipídico foi estimado por análise gravimétrica, relacionando a massa seca de células com a massa seca de lipídeos obtida.

(b) O volume restante no balão foi alocado em tubo de centrífuga. O balão foi rinsado com 10mL de éter de petróleo (5mL de cada vez) a fim de evitar perdas. Ao tubo de centrífuga foi adicionado 10mL de água destilada. Após a separação total das fases, a fase superior foi recolhida, com o auxílio de uma pipeta automática, colocado em um béquer e então em estufa a 105°C e pesado até peso constante. Em seguida, adicionou-se uma mistura (1:1) de água destilada:hexano que foi agitada vigorosamente para assegurar a

remoção do sal e de outros resíduos. Da amostra, com duas fases, foi recolhida a fase superior que foi colocada, com o auxílio de uma pipeta automática, em béquer, que foi pesado até peso constante. O quantitativo lipídico foi estimado por análise gravimétrica, relacionando a massa seca de células com a massa seca de lipídeos obtida.

2.3 Transesterificação

Os lipídeos obtidos foram submetidos à reação de metanólise, conforme metodologia descrita por YOO *et al.* (2010) com modificações.

Primeiro foi realizado a saponificação com 1mL de solução saturada de KOH-CH₃OH (potassa alcoólica) à 75° por 10 minutos em Banho Maria Nova Ética. Em seguida os lipídeos foram submetidos a metanólise com 2mL de metanol com 5% de HCL à 75°C por 10 minutos. Estas etapas foram realizadas em frasco fechado para evitar evaporação. A fase contendo os ácidos graxos foi separada com a adição de 2mL de água destilada e 2mL de hexano P.A.. A fase superior, de hexano, foi recolhida com pipeta automática e transferida para frascos de vidro que foram colocados em estufa à 60°C para a evaporação do solvente e concentração da amostra.

2.4 Perfil de Ésteres Metílicos

Para realizar a análise do perfil lipídico foi adicionado 300µL de Heptano P.A. às amostras que foram agitadas manualmente até homogeneização e em seguida eluídas em cromatógrafo gasoso (CG).

As análises foram realizadas em CG da marca Shimadzu, modelo 2014, com injetor Split à 250°C com fluxo de 1mL/min, detector FID à 250°C e forno à temperatura isotérmica de 200°C. Foi utilizada coluna capilar Carbowax 20M, da marca Quadrex, com fase

estacionária de polietilenoglicol e dimensões de 30m x 0,32mm x 0,25µm.

Os ácidos graxos foram identificados por comparação com amostra padrão e o perfil foi determinado pelas áreas integradas para cada pico. Todas as análises foram realizadas em duplicata de transesterificações distintas.

3. Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra os resultados obtidos nas extrações das microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* pelos métodos (a) clorofórmio/metanol e (b) éter de petróleo. A extração pelo método (b) foi mais eficiente, no entanto, obteve o maior desvio padrão. O melhor resultado foi obtido na extração da microalga *D. tertiolecta* por éter de petróleo com a média de 19,52% de lipídeo, próxima a quantidade média de lipídeos da soja (19,00%) (Jokic' *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Percentual de lipídeos totais nas microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* pelos métodos de extração (a) e (b).

Espécies	% Lipídeos (DP)	
	Método (a)	Método (b)
<i>D. tertiolecta</i>	11,91 (±1,48)	19,52 (±12,42)
<i>I. galbana</i>	12,55 (±3,93)	13,14 (±8,63)
<i>T. gracilis</i>	6,13 (±1,09)	9,07 (±2,57)

Métodos (a) - Extração pelo método (a) clorofórmio/metanol; Método (b) - Extração pelo método (b) éter de petróleo; DP = Desvio padrão

O solvente éter de petróleo mostrou-se com maior afinidade aos lipídeos presentes nas microalgas estudadas quando comparado a mistura de solventes clorofórmio/metanol, pois obteve a maior média de extração em todas as espécies. Entretanto, a eficiência é questionável quanto

Tabela 2 - Perfil lipídico das microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* pelos métodos de extração (a) e (b) e de biodieises comerciais.

Ésteres Metúlicos		Matérias-prima								
		D. ter. (a)	D. ter. (b)	I. gal. (a)	I. gal. (b)	T. gra. (a)	T. gra. (b)	Soja ¹	Sebo ²	Palma ³
C12:0	ND		0,95 (±1,11)	0,07 (±0,02)	0,10 (±0,00)	ND	0,20 (±0,17)	-	-	0,47
C14:0	0,39 (±0,01)		0,79 (±0,27)	22,97 (±0,24)	29,12 (±4,21)	0,61 (±0,04)	2,15 (±1,54)	0,06	0,99	0,88
C16:0	27,57 (±0,84)		31,81 (±0,79)	23,63 (±0,60)	32,45 (±4,59)	29,52 (±0,29)	39,13 (±11,55)	10,46	15,08	45,86
C16:1	12,49 (±0,62)		8,05 (±1,48)	8,48 (±0,10)	7,76 (±1,06)	10,97 (±0,05)	9,72 (±8,20)	0,07	0,69	0,26
C18:0	1,55 (±0,10)		1,98 (±0,17)	1,69 (±0,02)	1,99 (±0,05)	1,90 (±0,21)	3,37 (±2,04)	2,42	9,15	4,40
C18:1	46,49 (±0,12)		43,99 (±3,01)	37,14 (±0,43)	22,71 (±6,00)	43,94 (±0,60)	32,76 (±9,89)	24,65	26,56	39,49
C18:2	2,86 (±0,42)		4,40 (±1,73)	1,45 (±0,03)	1,80 (±1,91)	1,70 (±0,00)	2,33 (±0,27)	55,80	41,86	8,03
C18:3	4,03 (±0,36)		1,13 (±0,48)	0,68 (±0,02)	0,28 (±0,10)	4,82 (±0,04)	0,49 (±0,29)	5,65	4,90	0,26
C20:0	0,24 (±0,02)		0,08 (±0,01)	0,59 (±0,02)	0,35 (±0,12)	0,36 (±0,01)	0,88 (±0,22)	0,23	0,24	0,22
C20:1	3,56 (±0,01)		4,36 (±1,01)	0,49 (±0,11)	1,08 (±0,55)	4,05 (±0,05)	7,10 (±1,54)	0,18	0,22	0,11
C22:0	0,05 (±0,01)		1,34 (±1,69)	2,33 (±0,08)	2,06 (±0,02)	1,50 (±0,05)	0,25 (±0,04)	0,22	0,23	0,03
C22:1	0,03 (±0,01)		1,11 (±0,84)	0,37 (±0,04)	0,29 (±0,08)	0,07 (±0,01)	1,62 (±1,08)	0,07	0,03	0,01

D. ter - *Dunaliella tertiolecta*; *I. gal.* - *Isochrysis galbana*; *T. gra.* - *Tetraselmis gracilis*; (a) - Extração pelo método (a) clorofórmio/metanol; (b) - Extração pelo método (b) éter de petróleo; ¹ - Alcantara et al., 2000; ² - Moraes, 2008; ³ - May et al., 2005; (±) - Desvio Padrão, ND - Não detectado.

levando em consideração o tempo e energia gastos, maior na extração por Soxhlet (Jiménez *et al.*, 2009).

O alto valor do desvio padrão encontrado nas extrações pelo método (b), principalmente *D. tertiolecta* ($\pm 12,42$) e *I. galbana* ($\pm 8,63$), deve-se a presença de sal e possível detrimento de contato do solvente com a amostra. Na extração por Soxhlet a amostra encontra-se alocada em um cartucho onde é percolada pelo solvente (Figura 1). A amostra é composta em média por 95% de sal, que pode se aglomerar e prejudicar o contato do solvente com a microalga, logo, a extração de lipídeos. Mesmo o método (a), onde há agitação e maior contato do solvente com a amostra, a grande quantidade de sal pode prejudicar a extração, como observado em *I. galbana* ($\pm 3,93$). No entanto, a extração (a) mostrou resultados com o menor desvio padrão em todas as espécies.

A tabela 2 mostra o perfil dos ésteres metílicos obtidos das microalgas estudadas e o de biodieseis comerciais. Os ésteres mais abundantes foram C18:1, C16:0 e C16:1, respectivamente, porém a composição pode variar dependendo da fase em que a microalga foi coletada devido a seus processos metabólicos (Harwood *et al.*, 2009). Dentre os biodieseis comerciais o biodiesel de microalga se aproxima mais do biodiesel ao biodiesel de palma.

O método (a) mostrou-se mais eficiente na extração dos óleos que compõe os ésteres C16:1, C18:1 e C18:3. Para os ésteres C12:0, C14:0, 16:0, 18:0, 18:2 e 20:1 o método (b) obteve um melhor resultado. Os outros ésteres (C20:0, 22:0 e 22:1) variaram conforme a espécie de microalga.

O biodiesel das microalgas estudadas mostra-se bastante estável. A grande quantidade de ésteres monoinsaturados (C18:1 e C16:1) oferecem ao biodiesel uma maior estabilidade à oxidação (Teixeira,

2006). Atualmente, empresas produtoras de biodiesel, principalmente de soja, adicionam biodiesel de sebo a fim de evitar a oxidação devido a grande quantidade de insaturações presentes no biodiesel de soja (Westbrook, 2010). Com a quantidade significativa de saturados presentes no biodiesel destas espécies de microalgas a adição de aditivos não seria necessária.

Já o alto valor de ésteres saturados (C16:0) proporciona ao produto final uma maior viscosidade (Hu *et al.*, 2008). Segundo Teixeira (2006), que estudou biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides*, embora o biodiesel desta microalga seja mais viscoso que os biodieseis comerciais ainda encontra-se dentro do padrão exigido pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) nesta análise laboratorial.

4. Conclusão

A extração pelo método (b) éter de petróleo foi mais eficiente, quando não levado em consideração o tempo e energia gastos no processo. O melhor resultado obtido foi da extração pelo método (b) da microalga *Dunaliella tertiolecta* com média de 19,52% de lipídeo. Para um biocombustível mais estável à oxidação, o método (a) poderia ser empregado, devido a sua característica de extrair mais ácidos graxos monoinsaturados (C16:1 e 18:1), abundantes nas microalgas estudadas. Uma vez que a finalidade seja um biocombustível com viscosidade elevada deve empregar o método (b), mais eficiente na extração de ácidos graxos saturados, como o C16:0, encontrado em grande quantidade nas três microalgas. O sal mostrou ser um inconveniente à extração, sugerimos em trabalho futuros utilizar amostras desalinizadas. Supõe-se, pela

composição lipídica, que o biodiesel das microalgas estudadas deverá possuir alta estabilidade à oxidação e maior viscosidade quando comparados a biodieseis comerciais, com características próximas ao biodiesel de palma.

Bibliografia

- ALCANTARA, R.; AMORES, L.; CANOIRA, L. *et al.* Catalytic production of biodiesel from soybean oil, used frying oil and tallow. **Biomass and Bioenergy**, v. 18, p. 515-527, 2000.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.
- CAMPOS, V.B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S.O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.
- COSTA, J.A.V.; RADMANN, E.M.; CERQUEIRA, V.S. *et al.* Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 17, n. 4, p. 429-436, out./dez., 2006.
- D'OCA, M.G.M.; VIÊGAS, C.V.; MACHADO, D.O. **Extração de óleo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de biodiesel.** In: XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul) FURB, Blumenau, Santa Catarina, 2008.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 497-509, 1956. Disponível em: <http://www.jbc.org> Acesso em: 05 de Outubro de 2010.
- GUILLARD, R.R.L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. *Culture of Marine Invertebrates Animals.* Plenum Publishing, New York, 1975. 29-60 p.
- HARWOOD, J.L.; GUSCHINA, I.A. The versatility of algae and their lipid metabolism. **Biochimie**, v. 91, p. 679-684, 2009.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E. *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. *et al.* Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.
- JIMÉNEZ, J.J.; BERNAL, J.L.; NOZAL, M.J. *et al.* Profile and relative concentrations of fatty acids in corn and soybean seeds from transgenic and isogenic crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7288-7295, 2009.
- JOHNSON, M.; WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 525-534, 2010.
- JOKIC', S.; ZEKOVIC', Z.; VIDOVIC', S. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of soybean oil: process optimisation and triacylglycerol composition. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1939-1946, 2010.
- LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN S. Y. *et al.* Comparison of serial methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource**

- Technology**, v. 101, p. 575-577, 2010.
- MAY, C.Y.; LIANG, Y.C.; FOON, C.S. *et al.* Key fuel properties of palm oil alkyl esters. **Fuel**, v. 84, p. 1717-1720, 2005.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X. *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1-5, 2008.
- MORAES, M.S.A. **Biodiesel de sebo: avaliação de propriedades e teste de consumo em motor a diesel**. 2008. 27 p. dissertação (mestrado em química) – Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SCHENK, P.; THOMAS-HALL, S.; STEPHENS, E. *et al.* Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**, v. 1, p. 20-43, 2008.
- SKAJANES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 405-413, 2007.
- TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, E. – **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel**. In: *I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, 2006, Brasília. Anais do : I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília, DF: MCT/ABIPTI, p.91-96, 2006.
- VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresearches Technology**, v. 92, p. 297-305, 2004.
- World energy outlook 2007**. Paris: International Energy Agency, 2007.
- WESTBROOK, S. R.; MCCORMICK, R. L. Storage stability of biodiesel and biodiesel blends. **Energy Fuels**, v. 24, p. 690-698, 2010.
- YOO, C.; JUN, S.Y.; LEE, J.Y. *et al.* Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 71-74, 2010.