



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL
DA LUSOFONIA AFRO - BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE – PGEA**

GABRIELLY FERREIRA MOTA

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS UTILIZANDO LIPASES:
DESAFIOS E OPORTUNIDADES**

REDENÇÃO - CE

2021

GABRIELLY FERREIRA MOTA

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS UTILIZANDO LIPASES:
DESAFIOS E OPORTUNIDADES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PGEA da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, como requisitos à aprovação no componente curricular obrigatório código MAEA0005: Dissertação. Área de concentração: Processos Químicos.

Orientador: Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

REDENÇÃO - CE

2021

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Mota, Gabrielly Ferreira.

M871p

Produção de biodiesel de microalgas utilizando lipases: desafios e oportunidades / Gabrielly Ferreira Mota. - Redenção, 2022.
130f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, Programa de Pós-graduação em Energia e Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2022.

Orientador: Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

1. Microalgas. 2. Biocatalisador de lipase. 3. Biodiesel de microalgas. I. Título

CE/UF/BSP

CDD 338.4

GABRIELLY FERREIRA MOTA

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS UTILIZANDO LIPASES:
DESAFIOS E OPORTUNIDADES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PGEA da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, como requisitos à aprovação no componente curricular obrigatório código MAEA0005: Dissertação. Área de concentração: Processos Químicos.

Aprovada em: 16 /12 /2021.

BANCA EXAMINADORA

José Cleiton Sousa dos Santos

PROF. DR. JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Aluisio Marques da Fonseca

PROF. DR. ALUISIO DA FONSECA MARQUES

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Rita Karolinny Chaves de Lima

PROF^ª. DR^ª. RITA KAROLINNY CHAVES DE LIMA

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Maria Alexandra de Sousa Rios

PROF^ª. DR^ª. MARIA ALEXSANDRA DE SOUSA RIOS

Universidade da Federal do Ceará (UFC)

*Em memória de minha querida mamãe Ozana
Ferreira pelo amor incondicional, por cada
palavra dita, cada ensinamento e apoio em
todos os momentos da minha vida. Dedico
todo o meu sucesso!!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma vitória alcançada em minha vida, por ter me dado a estrutura para continuar os estudos, e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos que surgiram em meu caminho. Sei que “tudo posso naquele que me fortalece”.

À minha amada sobrinha Noemi Mota, pelo laço de amizade e companheirismo.

À minha irmã Danielly Mota e ao meu amado sobrinho Isaac Mota que me ajudaram a suportar os momentos de dificuldades, as angústias e insegurança do dia a dia.

Aos meus amigos, principalmente a Cristiana Sousa que me deram apoio e souberam entender a falta de atenção, companheirismo, essencial entre os laços de amizades.

Aos meus professores do PGEA, que a cada momento contribuíram para o meu aprendizado com apoio e compreensão durante a realização do curso.

Em especial, o professor e orientador Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, a quem admiro pelo exemplo de profissional e de pessoa humana, em que compreendeu as minhas limitações nessa produção acadêmica e os objetivos a serem alcançados. E com sua orientação me encaminhou ao conhecimento com responsabilidade e profissionalismo.

Aos colegas de caminhada no curso, e em especial à Isamayra Germano de Sousa e André Luiz Barros de Oliveira, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos da pesquisa, ao Jean Gleison Andrade do Nascimento, Francisco Silvio Maia, João Brandão Júnior e Débora Cristina Lima Ferreira, pelo companheirismo, força e entusiasmo nessa caminhada.

Ao laboratório (UNILAB), pelas análises e atenção durante o tempo que dediquei à pesquisa.

Em especial, à diretora Aila Maria da Costa, e aos coordenadores Felipe Nogueira Catunda, Viviane Araújo Souza e Maria do Socorro Gomes (equipe gestora da E.E.M. Deputado Fausto Aguiar Arruda) por todo apoio e compreensão necessários à realização desta pesquisa.

Aos meus alunos e ex-alunos e professores da E.E.M. Deputado Fausto Aguiar Arruda que fazem e fizeram parte de toda minha trajetória profissional.

E finalmente aos meus queridos colegas de turma, pela contribuição e compreensão em todos os momentos na construção do conhecimento.

Ao PGEA, pela oportunidade e CAPES, pelo incentivo a esta pesquisa. A todos, minha profunda gratidão.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir”.

Augusto Cury

RESUMO

A busca constante com fontes alternativas de energia tem aumentado devido aos impactos negativos causados pelos combustíveis fósseis sobre o meio ambiente. As microalgas são microrganismos que habitam ambientes marinhos e podem gerar biomassa devido a seu metabolismo acelerado. Seu uso em processos biotecnológicos têm sido abundantemente explorados ao longo dos anos. Esta revisão propõe o assunto em detalhes analisando e discutindo a produção de biodiesel a partir de microalgas adotando métodos de catálise enzimática, utilizando enzima lipase, os parâmetros que influenciam o sistema de reação, e suas vantagens, e desvantagens. Primeiro, apresentaremos as microalgas como possíveis produtores de biocombustível para aplicações industriais. Além disso, apresentam-se os possíveis métodos de imobilização enzimática e o uso de biocatalisadores de lipase nas reações de transesterificação conforme os meios de reação, como biorreatores e solventes orgânicos, descrevendo as melhorias em cada etapa. O possível interesse no desempenho em motores de biodiesel a partir de microalgas, os aspectos econômicos e ambientais do biodiesel de microalgas. Assim, a pesquisa teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre o óleo de microalga catalisada por lipase e todo o seu processo de obtenção de biodiesel, considerando os diversos aspectos, como questões de matéria-prima, catálise enzimática, métodos de produção e aspectos socioeconômicos e ambientais. Com isso, as prováveis tendências futuras para a indústria e a pesquisa científica, estas discussões provavelmente revisarão os avanços significativos com a lipase de microalgas e a tecnologia do óleo.

Palavras-chave: microalgas, biocatalisador de lipase, atividade catalítica, biodiesel de microalgas, aspectos econômicos.

ABSTRACT

The constant search for alternative energy sources has increased due to the negative impacts caused by fossil fuels on the environment. Microalgae are microorganisms that inhabit marine environments and can generate biomass due to their accelerated metabolism. Their use in biotechnological processes has been abundantly explored over the years. This review proposes the subject in detail by analyzing and discussing the production of biodiesel from microalgae by adopting enzymatic catalysis methods, using the enzyme lipase, the parameters that influence the reaction system, and its advantages, and disadvantages. First, we will present microalgae as possible biofuel producers for industrial applications. Furthermore, the possible enzyme immobilization methods and the use of lipase biocatalysts in transesterification reactions according to the reaction media, such as bioreactors and organic solvents, are presented, describing the improvements in each step. The possible interest in the performance in biodiesel engines from microalgae, the economic and environmental aspects of biodiesel from microalgae. Thus, the research aimed to conduct a literature review on lipase-catalyzed microalgae oil and its entire process of obtaining biodiesel, considering the various aspects, such as feedstock issues, enzymatic catalysis, production methods, and socioeconomic and environmental aspects. With this, the likely future trends for industry and scientific research, these discussions will likely review the significant advances with microalgae lipase and oil technology.

Keywords: microalgae, lipase biocatalyst, catalytic activity, microalgae biodiesel, economic aspects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação da evolução das microalgas versus as microalgas do biodiesel de acordo com números de artigos publicados pela Scopus de 1993 a 2020.	23
Figura 2: Diferentes usos de microalgas	25
Figura 3: Caracterização da biomassa das microalgas para produção de biodiesel.	26
Figura 4: Vantagens oferecidas pelas microalgas.	27
Figura 5: Esquema de tratamento de água/efluentes industriais através do plantio e cultivo de microalgas.	29
Figura 6: Etapas da produção de biodiesel a partir de microalgas.	31
Figura 7: Diferentes processos de extração de óleo/lipídio de microalgas.	33
Figura 8: Mecanismo da reação de transesterificação catalisada por ácido. O mecanismo foi proposto por (G. et al., 2013).	36
Figura 9: Mecanismo da reação de transesterificação catalisada por base. O mecanismo foi proposto por (G. et al., 2013).	37
Figura 10: Mecanismo da reação de transesterificação catalisada por enzima.	43
Figura 11: Métodos de imobilização de enzimas.	49
Figura 12: Principais tipos de projeto de reatores. Esferas azuis (enzimas imobilizadas).	58
Figura 13: Catálise de reação na reação de transesterificação do fluido supercrítico.	69
Figura 14: Uso de líquidos iônicos na reação de transesterificação do óleo de microalgas.	74
Figura 15: Análise dos aspectos ambientais do biodiesel microalgas.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Apresenta as singularidades do metabolismo de cada cultivo de microalgas.	29
Tabela 2: Produção de biodiesel usando um catalisador ácido.	38
Tabela 3: Produção de biodiesel usando o catalisador básico.	40
Tabela 4: Produção de biodiesel usando catalisador enzimático.	44
Tabela 5: Diversos óleos de microalgas usados para produção de biodiesel enzimático em sistemas livres de solventes.	65
Tabela 6: Algumas aplicações de sistemas supercríticos para produção de biodiesel via modificação lipídica de microalgas.	70
Tabela 7: Comparação de microalgas e outras fontes de óleo para produção de biodiesel.	79
Tabela 8: Teor de óleo por porcentagem do teor de matéria seca de diferentes espécies de microalgas	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1. Procedimento metodológico	16
3. REFERÊNCIAS	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS UTILIZANDO LIPASES: DESAFIOS E OPORTUNIDADES	21
1. Introdução	23
1.1. Propriedades das microalgas	25
1.2. Cultura de microalgas	28
1.3. Extração de óleo de microalgas	31
1.4. Produção de biodiesel por microalgas	33
1.4.1. Catalisador	34
1.4.1.1. <i>Produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas usando catalisad. ácidos</i>	37
1.4.1.2. <i>Produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas usando catalisad. básicos</i>	39
1.4.1.3. <i>Produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas usando catalisadores enzimáticos</i>	42
2. Lipases	47
2.1. Imobilização de lipase	50
2.1.1. Adsorção	51
2.1.2. Ligação covalente	52
2.1.3. Crosslinking	54
2.1.4. Encapsulamento	55
2.1.5. Imobilização de lipases de microalgas	56
3. Produção de biodiesel de microalgas usando catalisador de lipase	57
3.1. Biorreatores	57
3.2. Sistemas de Solventes Orgânicos	60
3.3. Sistemas livres de solventes orgânicos	63
3.3.1. Reação de transesterificação	63
3.3.2. Reação de Interesterificação	64
3.3.3. Combi-Lipase	65
3.4. Sistemas assistidos por ultrassom	66

3.4.1 Reação de transesterificação por ultrassom	67
3.5 Sistemas Supercríticos	68
3.6 Sistemas de líquidos iônicos	73
4. Desempenho do motor de biodiesel microalgas	74
5. Aspectos econômicos do biodiesel microalgas	78
6. Aspectos ambientais do biodiesel microalgas	86
7. Tendências futuras	89
8. Conclusão	90
Referências	93
5. CONCLUSÃO	130

1 INTRODUÇÃO

A questão da dependência energética dos combustíveis fósseis tem se tornado um grande desafio devido ao rápido consumo ao longo dos anos (MORAIS et al., 2020). Com intuito de reduzir esse consumo, os biocombustíveis são uma excelente alternativa para diminuir os impactos negativos no meio ambiente (AL-AMERI; AL-ZUHAIR, 2019). Com isso, as microalgas têm-se apresentado como excelentes fontes de energia por produzir abundantemente lipídios em média de 75% de biomassa seca, assim produzindo energia limpa convertidos em biodiesel. Além disso, apresentam alta eficiência fotossintética, crescimento rápido, alto rendimento energético e o cultivo pode acontecer em áreas não suscetíveis (LI et al., 2019; KHAN; SHIN; KIM, 2018; MORAIS et al., 2020; AHMAD et al., 2011).

Os diversos tipos de microalgas e o modo de cultivo influenciam no sistema de produção de lipídios (DE FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2019). Ademais, as diferentes estratégias aplicadas para extração do óleo de microalgas têm sido exploradas de modo a obter o aumento da produção de lipídios (DVORETSKY et al., 2016). Desse modo, o sistema de produção de microalgas pode acontecer em sistemas abertos ou fechados de biorreatores. Sendo que, em sistema fechado permite um melhor equilíbrio das condições de cultivo, no entanto, demanda alto custo de implementação e operação (SEYED HOSSEINI et al., 2016; ZNAD et al., 2012; ONCEL; SUKAN, 2008).

As microalgas têm-se evidenciado pelas aplicações biotecnológicas para produção do óleo de microalgas, pois requer catalisadores biológicos para otimizar as reações de transesterificação (MONDAL et al., 2017; DICKINSON et al., 2017). Os catalisadores biotecnológicos, as lipases, atuam em condições específicas como temperatura, pressão e pH (DE SOUZA et al., 2016). As reações de transesterificação podem acontecer na presença de uma base ou de um ácido (heterogêneo ou homogêneo) ou a partir de um catalisador enzimático (NASREEN et al., 2018). Sendo que, a utilização do solvente ideal depende exclusivamente do método que será utilizado para extrair os lipídios (KARIM et al., 2019; HIDALGO; CIUDAD; NAVIA, 2016). Embora, ambos os solventes polares e apolares podem ser extraídos simultaneamente e convertidos em biodiesel (KARIM et al., 2019; HIDALGO; CIUDAD; NAVIA, 2016; KIM et al., 2019).

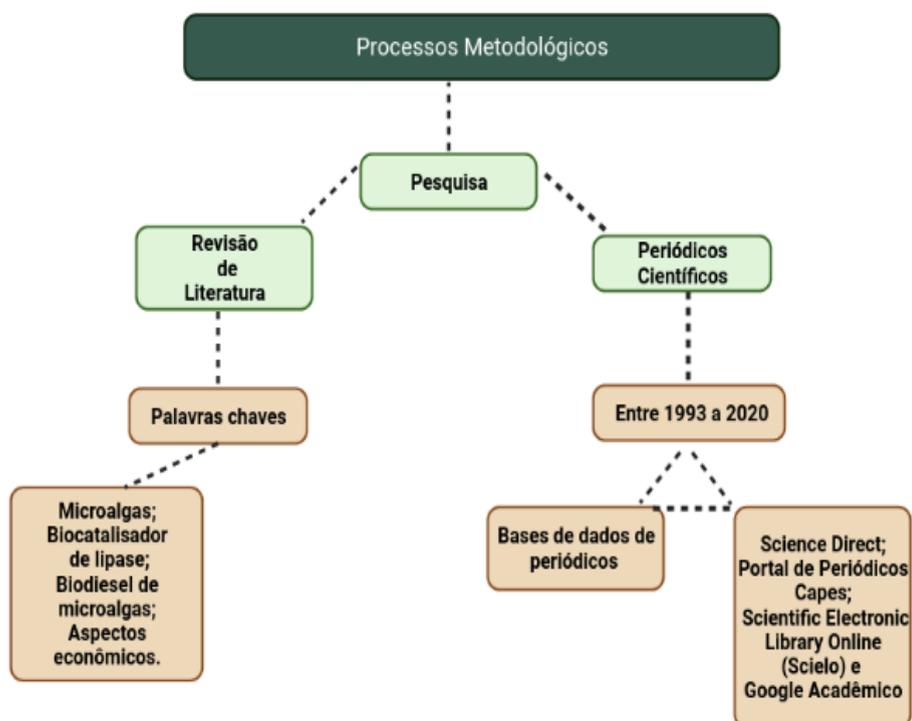
A pesquisa teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre o óleo de

microalga catalisada por lipase e todo o seu processo de obtenção de biodiesel, considerando os diversos aspectos, como questões de matéria-prima, catálise enzimática, métodos de produção e aspectos socioeconômicos e ambientais (DE JESUS et al., 2020). Desse modo, os objetivos específicos do estudo podem apresentar características relevantes para produção de lipídios a partir de microalgas, bem como de acordo com suas matérias-primas mais utilizadas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Destaca-se as propriedades gerais das microalgas para produção de lipídios; exemplificar os sistemas de produção de biomassa através de biorreatores; discutir os métodos de cultivo e extração de lipídios de microalgas; apresentar as lipases imobilizadas como biocatalisadores para otimizar a reação de transesterificação (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011); discutir as estratégias de reação de transesterificação para catálise enzimática em aplicações industriais; abordar o uso de solventes e de co-solventes para quebrar ligações e extrair lipídios para a produção de biodiesel; destacar as novas tecnologias utilizadas para a produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas na perspectiva socioeconômica e ambientalmente correta (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; CHEN et al., 2018).

Nesse contexto, essa revisão discute os mais variados aspectos na produção de biodiesel de microalgas como nova alternativa tecnológica de energia sustentável (MILANO et al., 2016; BRENNAN; OWENDE, 2010). Desse modo, a produção de biodiesel de microalgas a partir de biocatalisadores lipásicos, otimiza o desempenho das reações e assim incentiva novas pesquisas para produção de biocombustíveis ecologicamente sustentável.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimentos metodológicos



Fonte: MOTA (2021).

A pesquisa foi realizada por revisão de literatura utilizando palavras-chave como, microalgas, biocatalisador de lipase, biodiesel de microalgas, aspectos econômicos, dentre outras. O estudo se deu em periódicos científicos, priorizando os aspectos e avanços obtidos ao longo dos últimos anos entre 1993 a 2020. Os artigos investigados nesta revisão, foram obtidos por meio das bases de dados de periódicos da Scencedirect, Portal de Periódicos Capes, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Google Acadêmico que permitem o acesso à artigos publicados em periódicos de alto impacto científico e tecnológico no mundo. Assim, caracterizando as produções científicas que abordam como tema principal óleo de microalgas e suas respectivas pesquisas, capazes de desenvolver a produção de biodiesel industrialmente possível.

3 REFERÊNCIAS

AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. Ma.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011. ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2010.09.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>.

AL-AMERI, Mariam; AL-ZUHAIR, Sulaiman. Using switchable solvents for enhanced, simultaneous microalgae oil extraction-reaction for biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 141, p. 217–224, 2019. ISSN: 1873295X. DOI: 10.1016/j.bej.2018.10.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.10.017>.

AMARO, Helena M.; GUEDES, A. Catarina; MALCATA, F. Xavier. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 3402–3410, 2011. ISSN: 03062619. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.12.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010. ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009.

CHEN, Zhipeng; WANG, Lingfeng; QIU, Shuang; GE, Shijian. Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2018, 2018. ISSN: 23146141. DOI: 10.1155/2018/1503126.

DE FARIAS SILVA, Carlos Eduardo; BERTUCCO, Alberto. Bioethanol from microalgal biomass: A promising approach in biorefinery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 62, p. 1–14, 2019. ISSN: 16784324. DOI: 10.1590/1678-4324-2019160816.

DE JESUS, Sérgio S.; FERREIRA, Gabriela F.; MOREIRA, Larissa S.; FILHO, Rubens Maciel. Biodiesel production from microalgae by direct transesterification using green solvents. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 160, p. 1283–1294, 2020. ISSN: 18790682. DOI: 10.1016/j.renene.2020.07.056.

DE SOUZA, Ticiane C.; DE FONSECA, Thiago S.; DA COSTA, Jessyca A.; ROCHA, Maria Valderez Ponte; DE MATTOS, Marcos Carlos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana R. B.; DOS SANTOS, José C. S. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 130, p. 58–69, 2016. ISSN: 18733158. DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.05.007.

DICKINSON, Selena; MIENTUS, Miranda; FREY, Daniel; AMINI-HAJIBASHI, Arsalon; OZTURK, Serdar; SHAIKH, Faisal; SENGUPTA, Debalina; EL-HALWAGI, Mahmoud M. A review of biodiesel production from microalgae. **Clean Technologies and Environmental Policy**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 637–668, 2017. ISSN: 16189558. DOI: 10.1007/s10098-016-1309-6.

DVORETSKY, Dmitry; DVORETSKY, Stanislav; TEMNOV, Mikhail; AKULININ, Evgeniy; PESHKOVA, Evgeniya. Enhanced lipid extraction from microalgae *Chlorella*

vulgaris biomass: Experiments, modelling, optimization. **Chemical Engineering Transactions**, [S. l.], v. 49, p. 175–180, 2016. ISSN: 22839216. ISBN: 9788895608402. DOI: 10.3303/CET1649030.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010. ISSN: 13811177. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.11.010.

HIDALGO, Pamela; CIUDAD, Gustavo; NAVIA, Rodrigo. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 201, p. 360–364, 2016. ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.031. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.031>.

KARIM, Ahasanul; AMIRUL ISLAM, M.; KHALID, Zaiid Bin; FAIZAL, Che Ku Mohammad; KHAN, Md Maksudur Rahman; YOUSUF, Abu. **Microalgal cell disruption and lipid extraction techniques for potential biofuel production**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. ISBN: 9780128175361. DOI: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00009-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00009-6>.

KHAN, Muhammad Imran; SHIN, Jin Hyuk; KIM, Jong Deog. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018. ISSN: 14752859. DOI: 10.1186/s12934-018-0879-x.

KIM, Bora; HEO, Hyun Young; SON, Jeesung; YANG, Jeongwoo; CHANG, Yong Keun; LEE, Jay H.; LEE, Jae W. Simplifying biodiesel production from microalgae via wet in situ transesterification: A review in current research and future prospects. **Algal Research**, [S. l.], v. 41, n. May, p. 101557, 2019. ISSN: 22119264. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101557. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101557>.

LI, Kun et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 291, n. June, p. 121934, 2019. ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121934.

MILANO, Jassinnee; ONG, Hwai Chyuan; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, Man Kee; LOH, Ping Kwan; VELLAYAN, Viknes. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 58, p. 180–197, 2016. ISSN: 18790690. DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.150.

MONDAL, Madhumanti; GOSWAMI, Shrayanti; GHOSH, Ashmita; OINAM, Gunapati; TIWARI, O. N.; DAS, Papita; GAYEN, K.; MANDAL, M. K.; HALDER, G. N. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. **3 Biotech**, [S. l.], v. 7, n. 2, 2017. ISSN: 21905738. DOI: 10.1007/s13205-017-0727-4.

MORAIS, Michele Greque De; MORAIS, Etiele Greque De; CARDIAS, Bruna Barcelos; VAZ, Bruna da Silva; MOREIRA, Juliana Botelho; MITCHELL, B. Greg; COSTA, Jorge Alberto Vieira. **Microalgae as a source of sustainable biofuels**. [s.l.] : BV, 2020. ISBN: 9780128195970. DOI: 10.1016/b978-0-12-819597-0.00013-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-819597-0.00013-1>.

NASREEN, Sadia; NAFEES, Muhammad; QURESHI, Liaqat Ali; ASAD, Muhammad

Shahbaz; SADIQ, Ali; ALI, Syed Danial. Review of Catalytic Transesterification Methods for Biodiesel Production. **Biofuels - State of Development**, [S. l.], 2018. DOI: 10.5772/intechopen.75534.

ONCEL, S.; SUKAN, F. Vardar. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 99, n. 11, p. 4755–4760, 2008. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.068.

SEYED HOSSEINI, Nekoo; SHANG, Helen; ROSS, Gregory M.; SCOTT, John Ashley. Comparative analysis of top-lit bubble column and gas-lift bioreactors for microalgae-sourced biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 130, p. 230–239, 2016 a. ISSN: 01968904. DOI: 10.1016/j.enconman.2016.10.048.

ZNAD, Hussein; NADERI, Gita; ANG, H. M.; TADE, M. O. CO₂ Biomitigation and Biofuel Production Using Microalgae: Photobioreactors Developments and Future Directions. **Advances in Chemical Engineering**, [S. l.], 2012. DOI: 10.5772/32568.

4 RESULTADO

O resultado obtido mediante o desenvolvimento deste trabalho proporcionou a elaboração do artigo de revisão discriminado abaixo:

4.1. ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS UTILIZANDO LIPASES: DESAFIOS E OPORTUNIDADES

Obs.: Artigo aceito para publicação na Revista Algal Research sob número ALGAL-D-21-00543.

4.1 PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS UTILIZANDO LIPASES: DESAFIOS E OPORTUNIDADES

Gabrielly Ferreira Mota¹, Isamayra Germano de Sousa¹, André Luiz Barros de Oliveira³, Antonio Luthierre Gama Cavalcante², Katerine da Silva Moreira³, Francisco Thálysson Tavares Cavalcante³, José Erick da Silva Souza³, Italo Rafael de Aguiar Falcão¹, Thales Guimaraes Rocha¹, Roberta Bussons Rodrigues Valério², Francisco Simão Neto¹, Rita Karolinny Chaves de Lima¹, Maria Cristiane Martins de Souza¹ and José C. S. dos Santos^{1,3}*

¹ Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, Redenção, CEP 62790970, CE, Brazil.

² Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 940, CEP 60455760, Fortaleza, CE, Brazil.

³ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 709, Fortaleza, CEP 60455760, CE, Brazil.

*Correspondence: jcs@unilab.edu.br (J.C.S.S.)

RESUMO

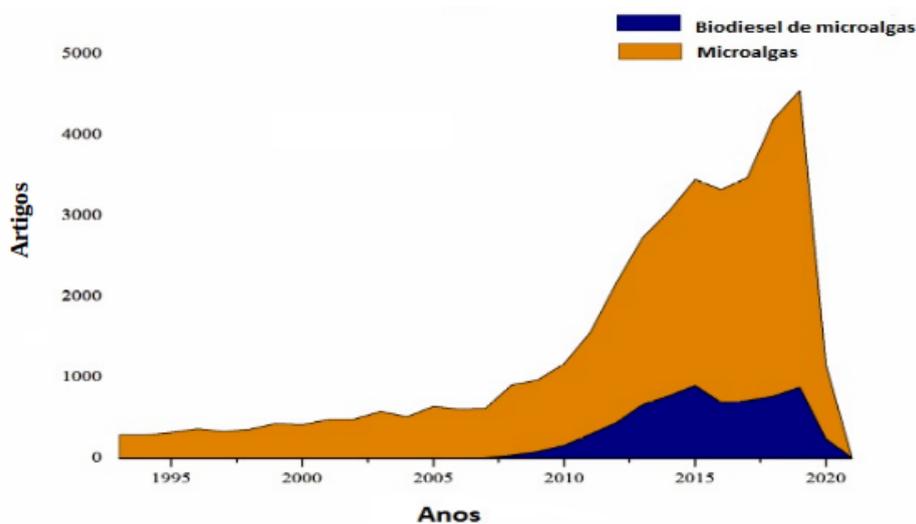
O consumo excessivo de combustíveis fósseis tem gerado graves problemas ambientais como o efeito estufa e a poluição. É fundamental identificar os principais fatores decorrentes dos impactos dos combustíveis fósseis e buscar alternativas tecnológicas, sustentáveis e econômicas para minimizar a situação atual. Com o avanço tecnológico, os biocombustíveis entraram em expansão, classificados como de alto potencial produzido a partir da biomassa. A produção de biodiesel a partir de microalgas na obtenção de energia limpa e renovável busca desempenhar um papel significativo no quadro econômico e ambiental. Portanto, os biocombustíveis a partir do óleo de microalgas se destacam no setor de energia ou por serem um combustível produzido por misturas de ésteres etílicos, ou ésteres metílicos de ácidos graxos, gerados pela síntese de óleo com álcool na presença de biocatalisador de lipase. Assim, as perspectivas e desafios estão relacionados a novas tecnologias aplicadas aos biocombustíveis gerados a partir de microalgas para viabilizar processos e serviços caracterizados como eficientes em termos energéticos e ecologicamente corretos. Diante desse contexto, esta revisão descreve os principais aspectos associados à produção de biodiesel de microalgas, destacando as propriedades fundamentais, os processos de imobilização, o uso de solventes para otimizar todo o meio reacional, os sistemas de biorreatores, bem como, o processo de otimização do desempenho do motor a biodiesel de microalgas, considerando os aspectos econômicos e ambientais. Prováveis tendências futuras para a indústria e a pesquisa científica proporcionarão discussões sobre os avanços significativos no uso de lipase de microalgas e tecnologia de lipídeos para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: microalgas, biocatalisador de lipase, atividade catalítica, biodiesel de microalgas, aspectos econômicos.

1 Introdução

As microalgas são cepas unicelulares que proporcionam um interesse significativo em se destacar como favoráveis na produção de biodiesel (GENDY; EL-TEMAMY, 2013; MAKAREVICIENE; SENDZIKIENE, 2020). Eles habitam ambientes marinhos e geram biomassa devido ao seu metabolismo acelerado, com condições ótimas como alto rendimento e eficiência energética através de determinadas técnicas em um curto período, produzindo em paralelo energia renovável para formar combustíveis líquidos ou gasosos (VIRMOND et al., 2013). As principais vantagens do uso de microalgas são alta eficiência fotossintética, alta taxa de lipídios, rápido crescimento, alto rendimento e cultivo em locais específicos não suscetíveis a outras plantas, bem como cultivo em água salgada para produção de biocombustíveis (DE BOER et al., 2012; KHAN; SHIN; KIM, 2018; LI et al., 2020a; RODRIGUES et al., 2014). As microalgas têm se destacado atualmente por sua gama de aplicações biotecnológicas em sistemas de tratamento de água, descontaminação de metais pesados, principalmente na produção de biodiesel (DICKINSON et al., 2017). Conforme mostrado na Figura 1, sua importância é evidenciada pela comparação entre microalgas e microalgas do biodiesel, pelo expressivo crescimento do número de artigos científicos publicados ao longo dos anos.

Figura 1: Comparação da evolução das microalgas versus as microalgas do biodiesel de acordo com números de artigos publicados pela Scopus de 1993 a 2020. A importância é evidenciada pela comparação de microalgas versus microalgas do biodiesel pelo expressivo crescimento no número de artigos científicos publicados ao longo dos anos.



Fonte: MOTA (2021).

Conforme ilustrado na **Figura 1**, compreende-se que o uso das microalgas com passar dos anos vem ganhando espaço para aplicações biotecnológicas, principalmente na produção de biodiesel (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Devido à grande diversidade de microalgas, elas são consideradas capazes de firmar CO₂ atmosférico para produção de biomassa, podendo ser utilizadas em diversas aplicações industriais como alimentícias, farmacêuticas, biocombustíveis, entre outras (BRANCO-VIEIRA et al., 2020a; COELHO et al., 2019; FRANCO et al., 2013). Como as microalgas produzem biomassa para a produção de biocombustíveis, elas podem contribuir para uma matriz energética sustentável (MARTINS et al., 2016). É importante destacar que os tipos de microalgas e a forma de cultivo influenciam significativamente na produção de lipídios. Assim, diversos métodos são utilizados para aumentar a produção desse lipídio em células de microalgas em diferentes níveis de indução, seja com moléculas ou pela existência, ou ausência de fatores (por exemplo, nitrogênio) e condições específicas de crescimento (ALISHAH ARATBONI et al., 2019; SUN et al., 2018a). Além disso, diversos métodos de cultivo para coleta e centrifugação de biomassa são amplamente utilizados na eficiência da desidratação. Assim, os lipídios podem ser extraídos por CO₂ supercrítico ou solvente e transformados em biodiesel (CAETANO et al., 2020; CHENG et al., 2011; MATA et al., 2014; MUTANDA et al., 2011).

Os aspectos ambientais, econômicos e tecnológicos favoráveis à geração de biodiesel a partir de biomassa de microalgas por meio do potencial fotossintético é uma alternativa viável para redução dos impactos ambientais (MILANO et al., 2016; MONDAL et al., 2017). Assim, as perspectivas e desafios estão relacionados ao processo de otimização para aumento da produção de biomassa, à expansão de tecnologias de colheita, secagem e extração de lipídios em eficiência energética, bem como ao uso de nutrientes e dióxido de carbono, resultando em redução impactos ambientais e mitigação da demanda de energia (COELHO et al., 2019; MOHR; RAMAN, 2013; STOIMENOVSKI et al., 2012).

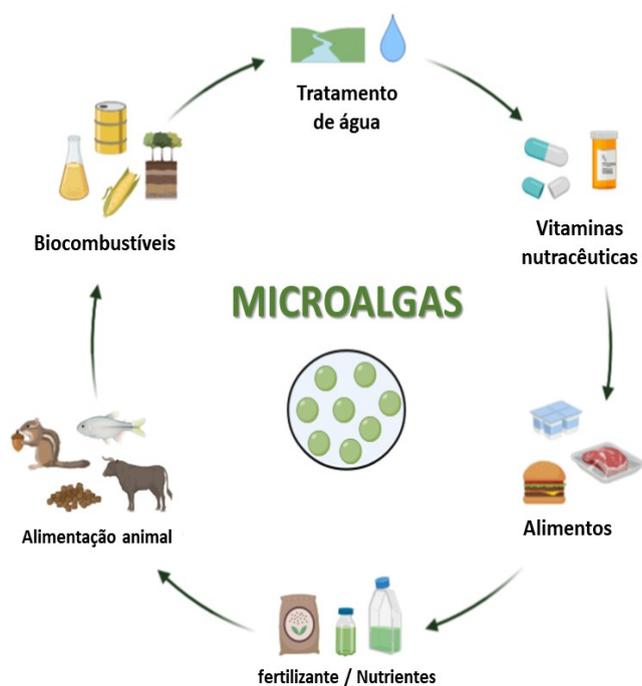
Diante desse contexto, esta revisão descreve os principais aspectos associados à produção de biodiesel de microalgas com base nas propriedades, extração e meios de produção. São destacados os principais processos de imobilização e de modo sustentável o uso de solventes para otimizar todo o meio reacional (TRAN et al., 2012). Assim, a produção de biodiesel de microalgas utilizando biocatalisadores de lipase em diversos sistemas influencia diretamente todo o processo de otimização do desempenho do motor a biodiesel de microalgas, considerando aspectos econômicos e ambientais (MONDAL et al., 2017).

Conseqüentemente, conhecer os desafios atuais e as perspectivas futuras, direcionando objetivamente a produção de biomassa de microalgas para a geração de biodiesel, tornando-o um ambiente ecologicamente sustentável (KHAN; SHIN; KIM, 2018; RAHEEM et al., 2018; RAVINDRAN et al., 2016).

1.1. Propriedades das microalgas

Microalgas são caracterizadas como cepas unicelulares que usam luz solar, água e dióxido de carbono para crescer, tendo muitas espécies variando de 200.000 a 800.000 (KOYANDE et al., 2019; MAHANA; GULIY; MEHTA, 2021). Elas têm sido foco de muitas pesquisas para suas diversas aplicações e podem gerar produtos de alto valor como pigmentos, proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos (DE MEDEIROS et al., 2021; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Algumas dessas aplicações podem ser constatadas na **Figura 2**.

Figura 2: Diferentes usos de microalgas. As microalgas têm sido fonte de diversas aplicações industriais para produção de biocombustíveis, tratamento de água, ração animal, alimentos, nutracêuticos e fertilizantes / nutrientes devido ao seu alto teor de lipídios e carboidratos.

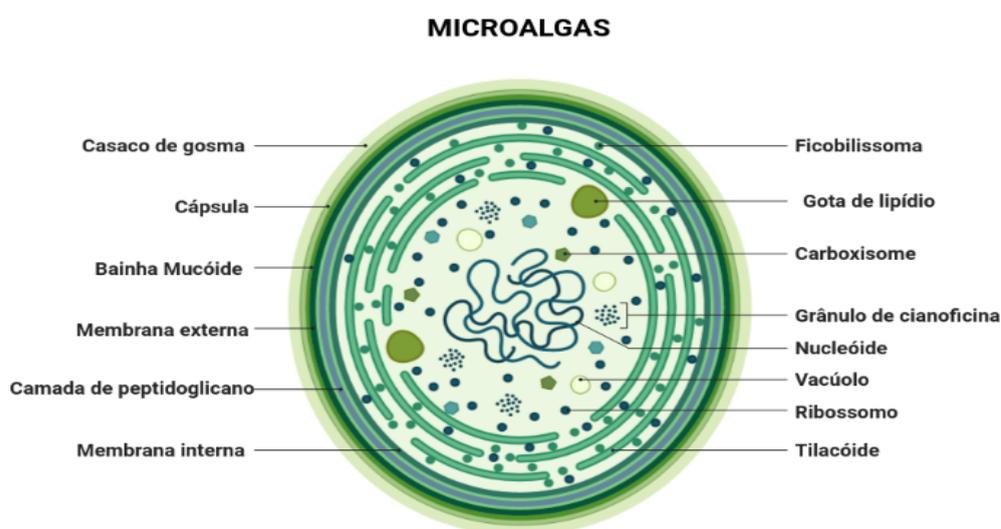


Fonte: MOTA (2021).

A produção em larga escala de biodiesel a partir da biomassa microalgas é benefício ambiental, como o controle da poluição, substituindo os combustíveis fósseis (ANANTHI et al., 2021a; OKORO; SUN; BIRCH, 2019). Além disso, seu uso reduz ou até elimina grande parte dos problemas associados à produção agrícola, pois apresentam taxas de crescimento mais rápidas, menor necessidade de nutrientes e não necessitam de terras agrícolas para sua produção (CHAKRABORTY; DUNFORD; GOAD, 2021; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; HUSSAIN et al., 2021).

As microalgas são classificadas de acordo com sua estrutura celular básica, ciclo de vida e pigmentação (HOSSAIN et al., 2020a). Eles aparecem na forma de algas procarióticas azuis e verdes (cianobactérias) e microalgas eucarióticas *Chlorophyta*, *Phaeophyta* e *Chrysophyceae*, verdes, marrons e douradas, respectivamente (BARATI et al., 2021; MADEIRA et al., 2017; MORAIS JUNIOR et al., 2020; NITSOS et al., 2020). As células de microalgas são compostas por paredes celulares, membranas, citoplasma, núcleo e organelas como mostrado na **Figura 3** (ARNOLD et al., 2015). Possuem também plastídios com clorofila, responsável pela fabricação dos alimentos por meio da fotossíntese e da ausência de um sistema vascular para transportar nutrientes, reduzindo sua necessidade de absorção por esse sistema (CHAI et al., 2021).

Figura 3: Caracterização da biomassa das microalgas para produção de biodiesel.

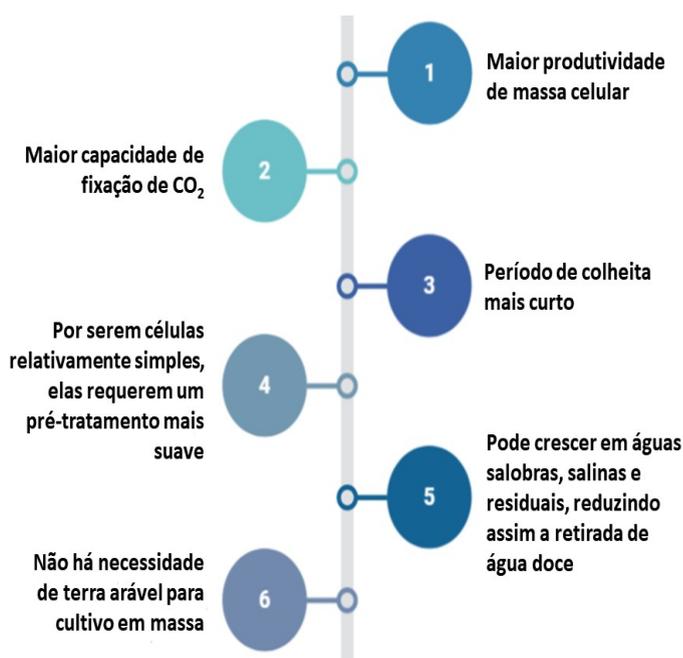


Fonte: MOTA (2021).

As microalgas têm um ciclo de vida mais curto do que todas as matérias-primas de biomassa, variando de 1 a 4 dias, enquanto culturas alimentares como arroz e milho requerem

entre 90 e 180 dias (BARSANTI; GUALTIERI, 2018). Sua eficiência fotossintética em safras suplementadas com CO₂ podeNITSOS et al., 2020). As células de microalgas são compostas por paredes celulares, membranas, citoplasma, núcleo e organelas como mostrado na Figura 3 (ARNOLD et al., 2015). Possuem também plastídios com clorofila, responsável pela fabricação dos alimentos por meio da fotossíntese e da ausência de um sistema vascular para transportar nutrientes, sendo de até 8,3%. Em comparação, a eficiência fotossintética das espécies de plantas terrestres é estimada em 4,6%, de modo que podem remover de 10 a 50 vezes mais CO₂ do que as plantas terrestres devido à maior concentração de clorofila por unidade de área (GONG; HUANG, 2020). Algumas das vantagens oferecidas pelo uso de microalgas podem ser constatadas na **Figura 4**.

Figura 4: Vantagens das microalgas. Algumas vantagens oferecidas pelo uso de microalgas proporcionam alta produtividade de biomassa, produtos de alto valor energético e redução de CO₂ no meio ambiente.



Fonte: MOTA (2021).

O alto teor de proteína e aminoácidos de alta qualidade das microalgas são alvos dos principais interesses da indústria de alimentos (BATISTA et al., 2019; MARTI-QUIJAL et al., 2019). Dessa forma, sistemas de produção de alimentos baseados em microalgas têm grande potencial para atender ao aumento da demanda por alimentos saudáveis e nutritivos decorrentes do crescimento da população mundial (BUCHMANN et al., 2019; PULZ; GROSS, 2004). Outra contribuição significativa das microalgas está relacionada ao fornecimento de água potável, pois as microalgas conseguem tornar o meio hídrico livre de

impurezas (POLITAYEVA et al., 2019; ZHU et al., 2019). Microalgas e bactérias podem se desenvolver juntas para remover materiais orgânicos, nutrientes em excesso, como compostos de nitrogênio e fósforo, compostos de metais pesados, contaminantes perigosos e patógenos de corpos d'água (BRAR et al., 2019; RAJA et al., 2008; WIBISONO et al., 2019). Nos últimos anos, o uso de microalgas para a biorremediação de nutrientes de vários fluxos de águas residuais foi relatado com sucesso (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2019). As microalgas apresentam-se como uma matéria-prima versátil, pois entre suas inúmeras vantagens, também apresentam um amplo potencial bioenergético, pois são flexíveis e capazes de produzir múltiplos biocombustíveis, incluindo biodiesel, bioetanol, biogás e biohidrogênio, utilizando apenas diferentes métodos de conversão (ENAMALA et al., 2018; VIEIRA SALLA et al., 2016).

1.2. Cultura de microalgas

A produção de microalgas é um assunto latente, atual e desafiador para a maioria dos institutos de pesquisa (CHOJNACKA, 2003; COELHO et al., 2019; PANG et al., 2019a). Deve-se observar que muitas indústrias estão interessadas no cultivo de microalgas em águas residuais, de processos de fabricação, para biorremediação e tratamento sustentável desses efluentes (MOLAZADEH et al., 2019; PANG et al., 2019a; SONG et al., 2019a, 2019b; VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). Além disso, o plantio e cultivo de microalgas nessas regiões industriais permite uma redução significativa do dióxido de carbono (CO₂) atmosférico por meio do processo e da fotossíntese, combatendo a intensificação do efeito estufa e reduzindo o aquecimento global (COELHO et al., 2019; MOLAZADEH et al., 2019; SONG et al., 2019b; TAN et al., 2020; VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). A seguinte **Figura 5** expressa a forma padrão de cultivo de microalgas:

Figura 5: Esquema de tratamento de água / efluentes industriais através do plantio e cultivo de microalgas. Microalgas fornecem eficiência fotossintética em escala industrial na remoção de resíduos e absorção de CO₂.



Fonte: MOTA (2021).

O cultivo de microalgas pode ser realizado em três formas clássicas, dependendo do tipo metabólico da microalga: autotrófica, heterotrófica e mixotrófica (utiliza-se de substâncias inorgânicas para produzir o seu próprio alimento por fotossíntese) (ABOMOHRA; ALMUTAIRI, 2020; BILAD; ARAFAT; VANKELECOM, 2014; SUPARMANIAM et al., 2019). As técnicas / metabolismo são diferenciadas pela fonte de carbono e energia utilizada (OKORO et al., 2019; SMETANA et al., 2017; ZHAN; RONG; WANG, 2017). Por fim, o metabolismo do cultivo fotoheterotrófico é utilizado pela energia da luz apenas como fonte de energia, sendo que a fonte e o carbono vêm apenas de compostos orgânicos (CHOJNACKA, 2003). A **Tabela 1** mostra as características fundamentais do metabolismo de produção de cada microalga.

Tabela 1: Os principais tipos de cultivo de microalgas conforme as características metabólicas para a produção de lipídios. O processo de produção de biomassa por meio do cultivo de microalgas apresenta diversas aplicações industriais, principalmente na produção de biodiesel.

Tipo de cultivo	Fonte de carbono	Variabilidade do metabolismo	Fonte de energia	Rendimento da biomassa	Aplicação
-----------------	------------------	------------------------------	------------------	------------------------	-----------

Autotrófico	Adsorção de CO ₂	Apenas autotrófico	Solar	Baixo	Indústrias geradoras de CO ₂
Heterotrófico	Matéria orgânica	Principalmente heterotrófico	Orgânico	Médio	Indústria alimentícia gerando lixo orgânico
Mixotrófico	Matéria orgânica / CO ₂	Utilização Simultânea	Solar e Orgânico	Extremamente alto	Geradores de águas residuais. Ambas as Indústrias
Fotoheterotrófico	Principalmente Matéria orgânica	Dependendo das condições variáveis	Solar	Alto	Ambas as Indústrias

Fonte: MOTA (2021).

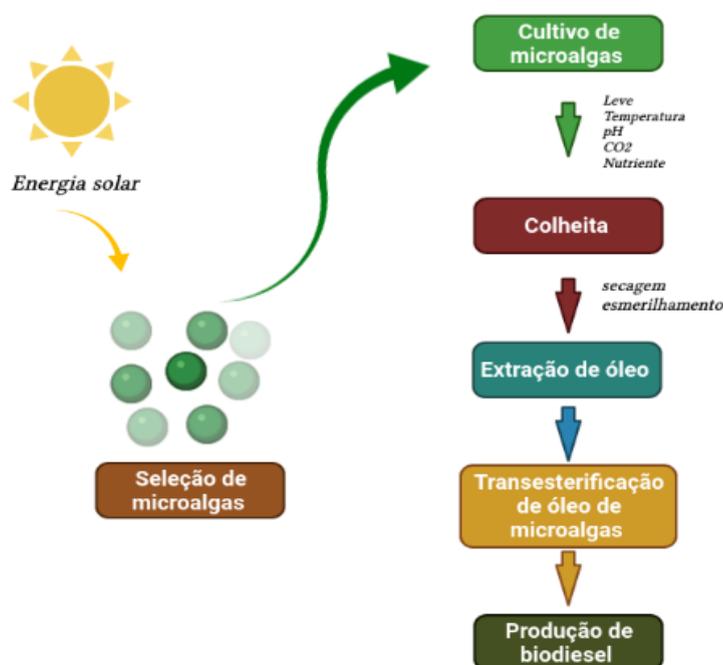
No entanto, os tipos de metabolismo apresentam vantagens, desvantagens e desafios (D'ESTE; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2017; SMETANA et al., 2017; VERMA; SRIVASTAVA, 2018; ZHAN; RONG; WANG, 2017). Nessa perspectiva, pressupõe-se que a escolha do melhor método (metabolismo) deve se basear principalmente no objetivo ou aplicação final desta biomassa (microalgas) esgotando a eficiência máxima da técnica e do produto (BILAD; ARAFAT; VANKELECOM, 2014; BWAPWA; ANANDRAJ; TROIS, 2017; JEZ et al., 2017). Nesse sentido, o metabolismo fotoautotrófico é o mais aplicado no cultivo de microalgas específicas (GANESAN et al., 2020; LEITE; HOFFMANN; DANIEL, 2019; LI et al., 2020b; NGUYEN; RITTMANN, 2015; SAKA; KAYA; BEKIROĞULLARI, 2020; VERMA; SRIVASTAVA, 2018). Essa característica se deve aos benefícios oferecidos por esse tipo de cultivo, sendo a adsorção de CO₂ de processos industriais o aspecto positivo e sustentável central desse método, atenuando significativamente a emissão de gases que intensificam o efeito estufa, possibilitando um benefício ao meio ambiente e redução dos custos de produção da biomassa de microalgas (BRILMAN; GARCIA ALBA; VENEMAN, 2013; VARGAS-ESTRADA et al., 2020; YEN et al., 2015b). A **Tabela 1** esclarece os principais aspectos do cultivo de microalgas e o

ambiente mais favorável para sua produção / crescimento. Além disso, os processos de produção de biomassa se destacam por meio da otimização de experimentos, responsáveis pelos mais valiosos e decisivos avanços na produção de microalgas (KIM et al., 2020; TROFIMCHUK et al., 2020; WÁGNER et al., 2021; YU et al., 2021).

1.3. Extração de óleo de microalgas

As microalgas estão se tornando uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel devido às suas taxas de crescimento e alto teor de lipídios (PERALTA-RUIZ; GONZÁLEZ-DELGADO; KAFAROV, 2013; SHAHI et al., 2020). O sistema de produção de biodiesel a partir de microalgas é bem-sucedido em várias etapas (como mostrado na **Figura 6**), como cultivo, colheita de células, secagem de biomassa, pré-tratamento para quebra de estrutura celular, processo de extração de lipídios por diferentes métodos, purificação de óleo e reação de transesterificação dos óleos extraídos para conversão a ésteres metílicos (RANJITH KUMAR; HANUMANTHA RAO; ARUMUGAM, 2015). Além disso, o processo de extração das células de microalgas é realizado por solventes orgânicos. No entanto, são altamente tóxicos e voláteis, prejudiciais ao meio ambiente (KARIM et al., 2020).

Figura 6: Etapas da produção de biodiesel a partir de microalgas. O sistema de produção de biodiesel a partir de microalgas proporciona melhor extração do óleo e produz eficiência energética.

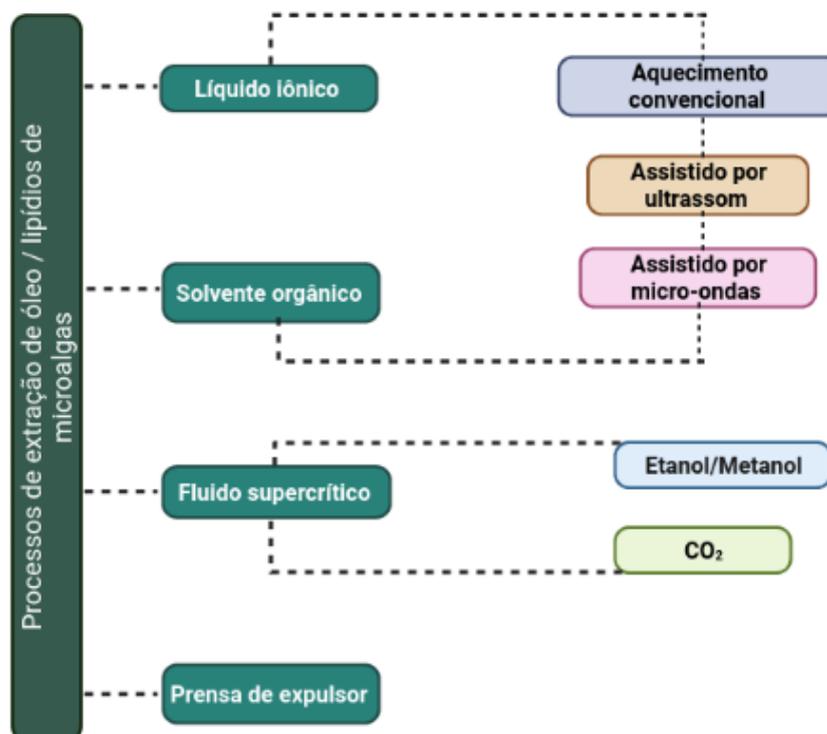


Fonte: MOTA (2021).

Como possíveis alternativas para extração do óleo de microalgas, o CO₂, têm mostrado resultados promissores no processo. No entanto, seus custos são elevados quando associados a altas pressões para obtenção de solventes supercríticos, tornando o processo caro de usar (BOROWITZKA, 1992; PATEL et al., 2020a). Nesse caso, a extração de óleo de microalgas através de líquidos iônicos têm despertado grande interesse (PIEMONTE et al., 2016). É importante destacar que o processo de extração está se tornando inovador. Anteriormente, os procedimentos de extração eram qualquer método executado. Com a inovação tecnológica, favoreceu os diversos métodos de extração para a produção de lipídios a partir de microalgas. Portanto, as técnicas mais favoráveis oferecem a quebra das paredes rígidas das microalgas para que as estruturas celulares sejam expostas e colocadas para secar, permitindo que o solvente alcance os óleos das microalgas para a produção de biodiesel (YOUNG et al., 2010).

Portanto, a obtenção de lipídios passa por duas rotas de processamento de biomassa celular seca e úmida para extração de óleo (LEE et al., 2010). A extração por via úmida é mais econômica, apesar de utilizar solventes orgânicos, tornando-a mais viável em escala industrial e eliminando o processo de secagem antes da extração de lipídios (GHASEMI NAGHDI et al., 2016). Microalgas podem crescer em várias fontes de carbono orgânico ou inorgânico e usar diferentes métodos de extração de lipídios, como mostrado na **Figura 7** (PATEL et al., 2020a; YELLAPU et al., 2018). Além disso, os procedimentos de extração do óleo de microalgas podem ser produzidos por técnicas mecânicas, físico-químicas, biológicas ou eletromagnéticas, que apresentam suas características de vantagens e desvantagens na obtenção de biodiesel (RASTOGI et al., 2018).

Figura 7: Diferentes processos de extração de óleo / lipídio de microalgas. Possíveis alternativas de extração de óleo de microalgas têm mostrado resultados promissores em processos industriais.



Fonte: MOTA (2021).

Os diferentes processos descritos para extração de lipídios de microalgas, como líquido iônico, solventes orgânicos, fluidos supercríticos, prensa de expulsão, são usados para fragmentar as células de microrganismos de óleo, mas a biomassa deve estar livre de umidade para a produção de biodiesel em escala industrial (CHENG et al., 2011; PATEL et al., 2020b). Ao analisar os métodos de extração, destacando as técnicas consideradas mais antigas e mais aplicadas para extração de lipídios, utilizando solventes orgânicos como clorofórmio, metanol e hexano na proporção de 2:1 em volume (BLIGH; DYER, 1959; FOLCH; LEES; STANLEY, 1957; KUMARI; REDDY; JHA, 2011). Portanto, a técnica de Folch pode extrair lipídios de um número máximo de amostras em um curto período, mas com a desvantagem da baixa sensibilidade em termos de tecnologia (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957).

1.4. Produção de biodiesel por microalgas

A produção e o consumo de energia fornecida a partir de combustíveis fósseis é um dos principais responsáveis pelo aumento da poluição ambiental. O processo de queima de

combustíveis fósseis promove a emissão de gases de efeito estufa para o meio ambiente, como o CO₂. O desenvolvimento de tecnologias para produção de biocombustíveis a partir da biomassa está sendo amplamente estudado e utilizado na indústria e surge como uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis (LI; SAKURAGI; MAKINO, 2019). A produção e o consumo de energia fornecida a partir de combustíveis fósseis são alguns dos principais fatores responsáveis pelo aumento da poluição ambiental. O processo de queima de combustíveis fósseis promove a emissão de gases de efeito estufa para o meio ambiente, como o CO₂. O desenvolvimento de tecnologias para produção de biocombustíveis a partir da biomassa está sendo amplamente estudado e utilizado na indústria e surge como uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis (HUSSEIN, 2015; LI; SAKURAGI; MAKINO, 2019).

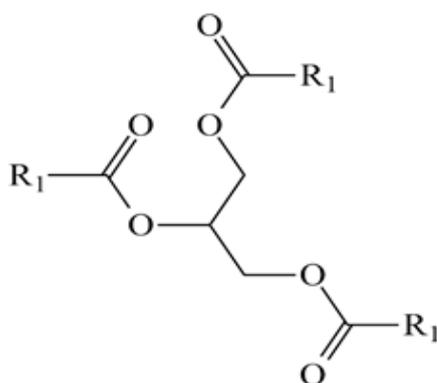
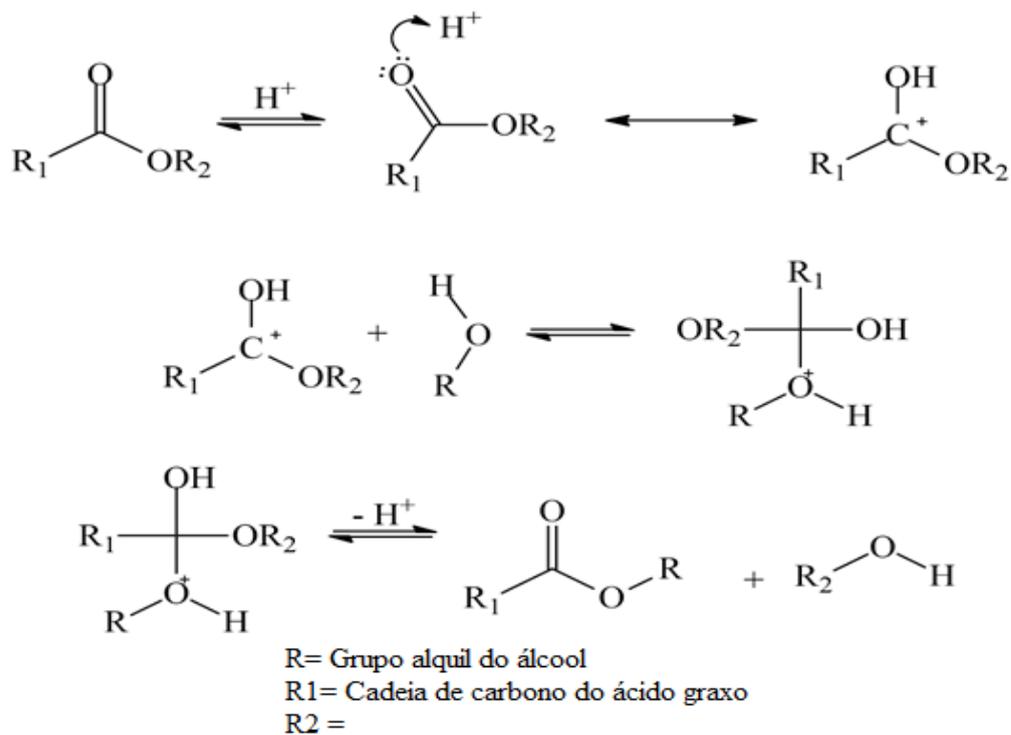
Biodiesel pode ser definido como um biocombustível formado por ésteres monoalquil (metílico ou etílico) de ácidos graxos de cadeia longa (AKUBUDE; NWAIGWE; DINTWA, 2019), produzidos a partir de bio-lipídeos de óleos vegetais, gordura animal ou microalgas óleo, na presença de álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) e um catalisador que pode ser de natureza química (ácidos e bases) ou bioquímica (enzimas), via processo de transesterificação, esterificação ou hidroesterificação (AKUBUDE; NWAIGWE; DINTWA, 2019; INDHUMATHI; SYED SHABUDEEN; SHOBA, 2014; KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018; MA et al., 2018; MOREIRA et al., 2020). É um biocombustível relativamente atóxico, de queima limpa, sem enxofre, ecológico e biodegradável (MOREIRA et al., 2020; SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018). Um dos maiores gargalos da comercialização do biodiesel é a relação custo-benefício quanto à origem da matéria-prima utilizada (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2016). As microalgas têm sido recomendadas como matéria-prima para a produção de biodiesel por serem mais viáveis e uma fonte rica em lipídios (AKUBUDE; NWAIGWE; DINTWA, 2019; SANI; DAUD; ABDUL AZIZ, 2013). Este conteúdo lipídico pode ser otimizado melhorando as técnicas de cepas e as condições de cultivo de várias maneiras para reduzir os custos de produção (ALASWAD et al., 2015).

1.4.1. Catalisador

Uma das etapas essenciais para atingir altos níveis de rendimento de biodiesel é a escolha do catalisador (CHOZHAVENDHAN et al., 2020; GOH et al., 2019). Catalisadores homogêneos convencionais (básicos e ácidos) são os mais usados para a produção de

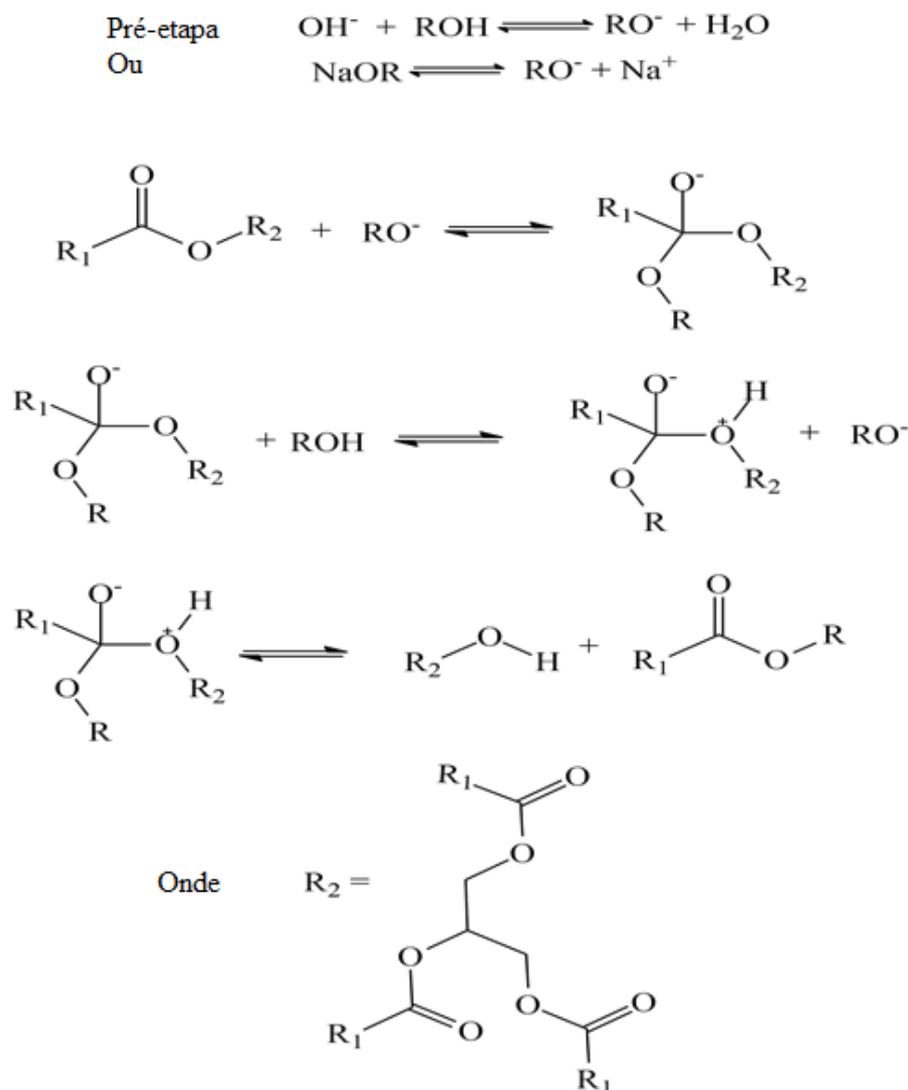
biodiesel e dependem do teor de ácidos graxos da matéria-prima (CHOZHAVENDHAN et al., 2020; NISAR et al., 2017; TIAN et al., 2017). Uma reação catalisada por um ácido ocorre quando o grupo carbonila pertencente aos triglicerídeos é protonado. O álcool presente na reação ataca o carbono protonado para formar um intermediário tetraédrico (como mostrado na **Figura 8**), no caso da reação catalisada por uma base, o alcóxido nucleofílico criado pelo álcool ataca o grupo da parte eletrofílica do grupo carbonila presente nos triglicerídeos (como mostrado na **Figura 9**) (ENDALEW; KIROS; ZANZI, 2011; SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018). No entanto, esses catalisadores homogêneos convencionais são difíceis de separar do meio de reação, resultando em custos adicionais devido à etapa de purificação do produto e gerando mais resíduos extras (BABAKI et al., 2017; CHOZHAVENDHAN et al., 2020; MOREIRA et al., 2020). Dito isso, usar enzimas como catalisadores é uma excelente escolha, pois podem ser rapidamente recuperadas do meio do produto, reduzindo o custo de produção do biodiesel (HAMA; KONDO, 2013; SANKARAN; SHOW; CHANG, 2016).

Figura 8: Mecanismo da reação de transesterificação catalisada por ácido. O Mecanismo foi proposto por (G. et al., 2013). Uma reação catalisada por ácido ocorre quando o grupo carbonila pertencente aos triglicerídeos é protonado. O álcool presente na reação ataca o carbono protonado para formar um intermediário tetraédrico.



Fonte: G., M. *et al.*, (2013).

Figura 9: Mecanismo da reação de transesterificação catalisada por base. O Mecanismo foi proposto por (LOZANO, 2010). Na reação catalisada por uma base, o alcóxido nucleofílico criado pelo álcool ataca a parte eletrofílica do grupo carbonila presente nos triglicerídeos.



R1 = Cadeia de carbono do ácido graxo

R = Grupo alquila de álcool

Fonte: LOZANO, (2010).

1.4.1.1. Produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas usando catalisadores ácidos

O uso de catalisadores ácidos é geralmente sugerido para reações de transesterificação e esterificação em que os óleos contêm uma quantidade significativa de ácidos graxos livres (FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984). Catalisadores ácidos são usados preferencialmente em reações de esterificação em vez de transesterificação, visto que

o rendimento da transesterificação alcalina é maior em relação à transesterificação ácida (AMINI et al., 2017; SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018). O ácido sulfúrico H_2SO_4 é comumente o catalisador mais amplamente utilizado (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018).

A produção de biodiesel usando um catalisador ácido é principalmente ignorada devido à sua lenta taxa de reação (TANGY et al., 2017). Se durante a reação catalisada por ácido, a taxa de reação foi aumentada como ocorre na reação catalisada por uma base, esta seria uma condição benéfica para reações usando ácidos graxos livres contendo, por exemplo, lipídios de microalgas (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018). Porém, os catalisadores ácidos apresentam algumas desvantagens, como baixa seletividade, problemas de corrosão, produção de ácidos residuais, que podem causar enormes danos ao meio ambiente (AGUIEIRAS et al., 2014; AMINI et al., 2017; MOREIRA et al., 2020). A **Tabela 2** mostra a produção de biodiesel a partir de microalgas e catalisadores ácidos.

Tabela 2: Produção de biodiesel com catalisador ácido. A produção de biodiesel com catalisadores ácidos como H_2SO_4 e HCL tem algumas desvantagens que podem causar enormes danos ao meio ambiente e baixa conversão de energia.

Substrato	Catalisador	Álcool	Razão molar (álcool: óleo) / Condições Experimentais	Conversão	Referência
Microalgas <i>Nannochloropsis oculata</i>	HCl	Metanol	80 °C, 2h e co-solvente Clorofórmio	23.1%	(CARVALHO JÚNIOR et al., 2011)
Lípidos de microalgas <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	H_2SO_4	Metanol	3:1/60 °C e 4h	10.6% e 8.4%	(D'OCA et al., 2011)
Óleo de microalga <i>Chlorella protothecoides</i>	H_2SO_4	Metanol	56:1/30 °C e 4h	63.0%	(MIAO; WU, 2006)
<i>A Chlorella sp.</i> óleo de biomassa de microalgas	H_2SO_4	Metanol	79: 1/60 °C, 8h e co-solvente éter dietílico	79.9%	(EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2012)

<i>A Chlorella sp.</i> óleo de biomassa de microalgas	H ₂ SO ₄	Metanol	79: 1/60 °C, 2h e Co-solvente éter dietílico	99.9 %	(EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2012)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i>	H ₂ SO ₄	Metanol	600:1/60 °C, 20 h e 380 rpm	77.6	(VELASQUEZ-O RTA; LEE; HARVEY, 2012)
Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis oceanica</i>	H ₂ SO ₄	Metanol	3:1/95 °C e 120 min	91.1%	(IM et al., 2014)
Biomassa de algas <i>Enteromorpha compressa</i>	H ₂ SO ₄	Metanol	5,5: 1/65 °C, 90 min e co-solvente Tetrahydrofurano	98.9%	(SUGANYA; KASIRAJAN; RENGANATHAN, 2014)
<i>A Chlorella sp.</i> óleo de biomassa de microalgas <i>Nannochloropsis Gaditana</i>	HCl	Metanol	95 °C e 2 h	90.0%	(KIM; IM; LEE, 2015)
Lípidos de microalgas de <i>I. zhangjiangensis</i> e <i>Chaetoceros sp.</i>	H ₂ SO ₄	Metanol	6:1/90 °C e 20 min	90.1%	(LIU et al., 2015)
Lípidos de microalgas de <i>Spirulina maxima</i>	H ₂ SO ₄	Metanol	12:1/60 °C, 400 rpm e 90 min	43.0%	(RAHMAN et al., 2017)
Óleo extraído da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i>	H ₂ SO ₄	Metanol	2.5:1/70 °C e 15 min	98.0%	(SINGH; PAL; MAJI, 2017)

Fonte: MOTA (2021).

1.4.1.2. Produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas usando catalisadores básicos

Na maioria dos estudos sobre produção de biodiesel, o catalisador enzimático foi utilizado no lugar do catalisador ácido (ATHAR; ZAIDI, 2020; SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018). Isso pode estar relacionado ao fato de que a reação catalisada por base ocorre mais rapidamente do que a catalisada pelo ácido (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Os catalisadores são responsáveis por fornecer maiores valores de conversão de biodiesel com um tempo de reação reduzido (LEUNG; WU; LEUNG, 2010; SHARMA; SINGH; KORSTAD, 2010). São economicamente viáveis como catalisadores, como o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH), de custo relativamente baixo (ATHAR; ZAIDI, 2020; SHARMA; SINGH; KORSTAD, 2010; SILITONGA et al., 2013).

No estudo desenvolvido pelos autores Chee Loong e Idris (2014), eles analisaram várias metodologias para produção de biodiesel usando duas espécies diferentes de microalgas, *Nannochloropsis sp* e *Tetraselmis sp* na presença de metanol e NaOH como catalisador (CHEE LOONG; IDRIS, 2014). O critério de seleção para escolher entre o catalisador básico e o ácido é baseado principalmente no teor de ácidos graxos livres (AGL) presentes nos óleos (ATHAR; ZAIDI, 2020). A alta concentração de AGLs em óleos limita o uso de um catalisador básico na produção de ésteres (QIAN; YUN; SHI, 2010; SHARMA; SINGH; KORSTAD, 2010; SILITONGA et al., 2013). Os catalisadores básicos são geralmente aplicados a óleos com AGLs inferiores a 0,5% em peso (HELWANI et al., 2009). Embora tenham muitos benefícios, esses catalisadores têm desvantagens. Catálise alcalina não homogênea, os ácidos graxos livres nas matérias-primas causam a formação de sabões, reduzindo os rendimentos de ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos, produzem glicerina e o catalisador não pode ser recuperado (BABAKI et al., 2017; CHOZHAVENDHAN et al., 2020; RAMACHANDRAN et al., 2013). Como resultado, catalisadores homogêneos como NaOH e KOH são mais adequados para matérias-primas com baixo teor de ácidos graxos livres (ATHAR; ZAIDI, 2020). A **Tabela 3** mostra a produção de biodiesel a partir de microalgas e catalisador básico.

Tabela 3: Produção de biodiesel usando o catalisador básico. A produção de biodiesel usando catalisadores básicos como NaOH e KOH são mais adequados para matérias-primas com baixo teor de ácidos graxos livres e fornecem melhor conversão de energia.

Substrato	Catalisador	Álcool	Razão molar (álcool: óleo) /	Conversão	Referências
-----------	-------------	--------	---------------------------------	-----------	-------------

Condições Experimentais					
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i>	NaOH	Metano 1	600:1/ 60 °C, 45 min e 380 rpm	77.6	(VELASQUEZ-ORTA; LEE; HARVEY, 2012)
Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	NaOH	Metano 1	12:1/ 50 °C (15 °C), 16 h e 800 W	83.3%	(CHEE LOONG; IDRIS, 2014)
Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	NaOH	Metano 1	6:1/ 50 °C (15 °C) e 400 W	76.7%	(CHEE LOONG; IDRIS, 2014)
Lípidos de microalgas de <i>Tetraselmis sp.</i>	NaOH	Metano 1	12:1/ 50 °C (15 °C), 16 h e 800 W	77.1%	(CHEE LOONG; IDRIS, 2014)
Lípidos de microalgas de <i>Tetraselmis sp.</i>	NaOH	Metano 1	6:1/ 50 °C (15 °C), e 400 W	70.0%	(RAHMAN et al., 2017)
Biomassa de <i>Spirulina sp.</i>	KOH	Metano 1	25 g de biomassa, 55 °C e 2 h	63.6%	(MARTÍNEZ et al., 2017)
Biomassa de <i>Spirulina sp.</i>	KOH	Metano 1	25 g de biomassa, 55 °C, 80 W	97.6%	(MARTÍNEZ et al., 2017)
Biomassa de <i>Spirulina sp.</i>	KOH	Metano 1	25 g de biomassa, 55 °C, 180 W	96.9%	(MARTÍNEZ et al., 2017)
Lípidos de microalgas de	KOH	Metano 1	9:1/ 65 °C, 600 rpm e 20 min	86.1%	(RAHMAN et al., 2017)

<i>Spirulina maxima</i>					
Lípidos de microalgas de <i>Scenedesmus sp</i>	NaOH	Metano 1	20:1/ 55 °C, 240 min e Co-solvent Hexano	95.0%	(SIVARAMAKRISHNAN ; INCHAROENSAKDI, 2017a)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella sp.</i>	NaOH	Metano 1	20:1/ 55 °C, 240 min, e Co-solvent Hexane	89.0%	(SIVARAMAKRISHNAN ; INCHAROENSAKDI, 2017a)
Lípidos de microalgas de <i>Scenedesmus sp</i>	NaOH	Metano 1	6:1 e 60 °C,	96.0%	(SIVARAMAKRISHNAN ; INCHAROENSAKDI, 2017a)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella sp.</i>	NaOH	Metano 1	6:1 e 60 °C	92.0%	(SIVARAMAKRISHNAN ; INCHAROENSAKDI, 2017a)

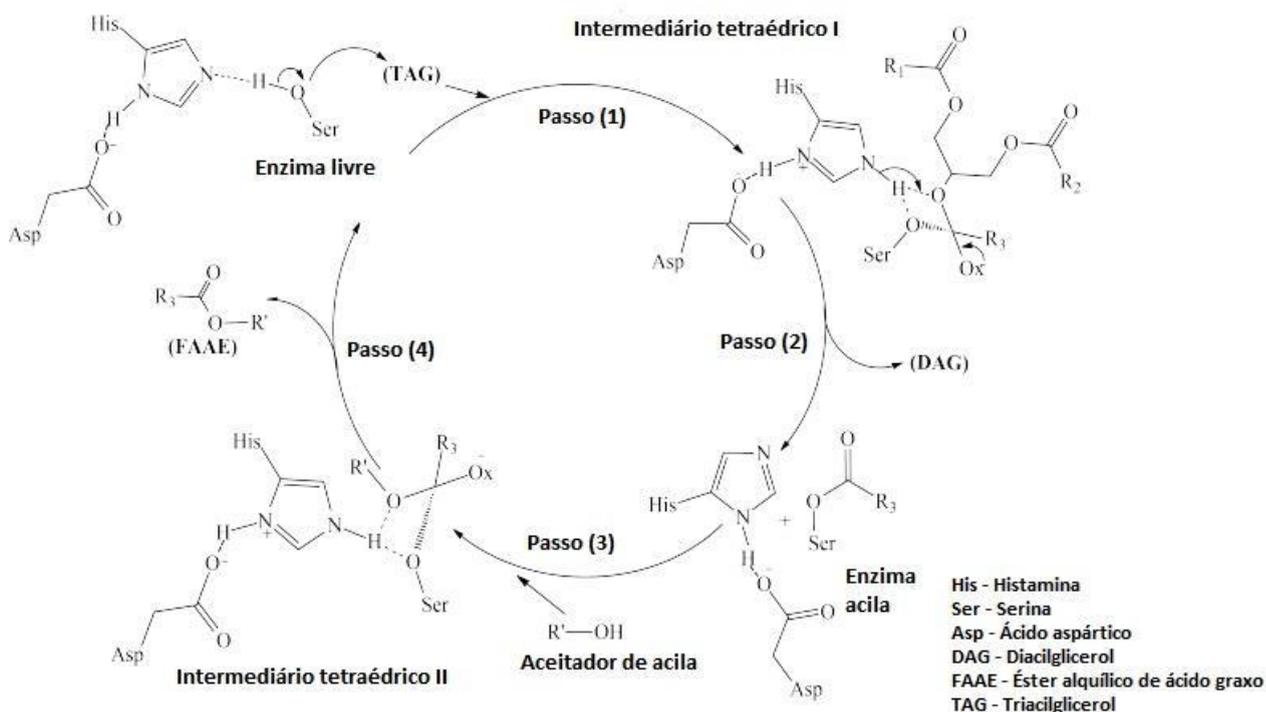
Fonte: MOTA (2021).

1.4.1.3. Produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas usando catalisadores enzimáticos

A busca por soluções mais sustentáveis nos processos industriais torna as enzimas cada vez mais atraentes e exigidas (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018). Entre as enzimas, a classe da lipases é a mais proeminente devido à sua versatilidade na realização de reações de biotransformação, como esterificação, transesterificação, hidrólise acidolítica (AGUIEIRAS et al., 2019; CHOI et al., 2018; CHOJNACKA; GŁADKOWSKI, 2018). Com isso, sua aplicação foi ampliada na indústria de biocombustíveis gerados a partir de biomassa, como o biodiesel (OKORO; SUN; BIRCH, 2019; SEKOAI et al., 2019) (como mostrado na **Figura 10**). Devido ao seu potencial, inúmeros estudos sobre a produção de biodiesel por catálise enzimática estão sendo desenvolvidos durante cada passo da reação (ATHAR; ZAIDI, 2020; HAMA; NODA; KONDO, 2018). Durante o processo da reação o passo (1), o aminoácido histamina atrai o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila da serina, produzindo um ânion oxigênio. Em seguida, ataca um átomo de carbonila do (TAG), resultando no tetraedro I intermediário. Passo (2) o próton da histamina é transferido para o DAG de separação,

formando um intermediário da acil-enzima. Passo (3) o éster de serina interage com a molécula de álcool. Primeiro, o átomo de nitrogênio na histamina atrai o átomo de hidrogênio no álcool, gerando um ânion alquilóxi ($R-O^-$). Este ânion de oxidação de alquil ataca o átomo de carbono carbonila do éster de serina, produzindo o tetraedro II intermediário. Passo (4) finalmente, a molécula FAAE e a enzima livre são liberadas (AL-ZUHAIR, 2007; JEGANNATHAN et al, 2008), fração alquil de cadeia curta R' do álcool, frações acil de cadeia longa R_1-R_3 , Ser serina, ácido aspártico Asp, átomo de oxigênio de Boi. O mecanismo foi proposto por (RÖTTIG et al., 2010).

Figura 10: Mecanismo da reação de transesterificação catalisada por enzimas. A reação de catálise enzimática especificada na figura ocorre em etapas: (1) O aminoácido histamina atrai o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila na serina, produzindo um ânion oxigênio resultando no tetraedro intermediário I. (2) O próton histamina é transferido para o DAG de separação, formando um intermediário de acil-enzima. (3) O éster de serina interage com a molécula de álcool, gerando um ânion alquilóxi ($R-O^-$) que ataca o átomo de carbono carbonila do éster de serina, produzindo o tetraedro intermediário II. (4) Por fim, a molécula FAAE e a enzima livre são liberadas (RAHMAN et al., 2017; SINGH; PAL; MAJI, 2017).



Fonte: Adaptado de RAHMAN; SINGH; PAL; MAJI, (2017).

Visando eliminar os obstáculos que ocorrem na catálise química da microalga homogênea, a lipase recombinante foi utilizada por (HUANG; CAI; LAPITSKY, 2015). A enzima livre chamada Lipase GH2 foi produzida com sucesso usando a lipase *Rhizomucor miehei* expressa em *Pichia Pastoris*. Com isso, é usado para converter cataliticamente os

lipídeos de *Chlorella Vulgaris* na presença de etanol ou metanol para a produção de biodiesel usando um sistema com solvente n-hexano. Um rendimento máximo de (90,0%) foi alcançado para os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) na faixa de 1: 3 - razão molar de 1: 5 (óleo: metanol), a uma temperatura de 30 °C após 24 h de reação com uma rotação de 150 rpm. Para os ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) foi alcançada uma conversão máxima de (95,0%), com uma razão molar de 1: 5 (óleo: metanol) e nas mesmas condições de reação apresentadas acima. A enzima reutilizada para ambos os processos, no caso da FAME a enzima foi reutilizada em 5 batidas sem perder sua atividade catalítica, no caso da FAEE na primeira reutilização, a atividade foi reduzida para 42%. O álcool etílico atuou como um inibidor da enzima. A lipase GH2 é eficiente na produção de FAME ou FAEE a partir do óleo de microalgas, desempenhando um papel essencial na redução dos custos do biodiesel (HUANG et al., 2015).

As enzimas apresentam uma série de vantagens como catalisadores, têm alto grau de eficiência e especificidade catalítica, atuam em condições de reação mais suaves de temperatura, pH e pressão, têm preferência por sistemas aquosos, são biodegradáveis, biocompatíveis e levam a reação à formação de um produto específico como a triacetina (éster de glicerina e ácido acético, considerado produto biodegradável) sem a formação de produtos tóxicos (BILAL et al., 2019; BORRELLI; TRONO, 2015; KRAJEWSKA, 2004; SHELDON; VAN PELT, 2013). A versatilidade das lipases em catalisar simultaneamente ácidos graxos e triglicerídeos e reduzir o consumo de energia em reações com baixa pressão e temperatura são os principais atrativos para a síntese enzimática do biodiesel (HAMA; KONDO, 2013; SANKARAN; SHOW; CHANG, 2016). As enzimas são catalisadores eficientes, pois podem fornecer processos mais competitivos do que catalisadores de natureza química devido às suas excelentes propriedades (CHOI; HAN; KIM, 2015; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). A **Tabela 4** mostra a produção de biodiesel usando microalgas e catalisadores enzimáticos.

Tabela 4: Produção de biodiesel com catalisador enzimático. O uso de microalgas e catalisadores enzimáticos em reações de transesterificação fornece altos níveis de conversão de lipídios para a produção de biodiesel.

Substrato	Catalisador	Álcool	Razão molar (álcool: óleo) / Condições Experimentais	Conversão	Referências
------------------	--------------------	---------------	---	------------------	--------------------

Lípidos de microalgas de <i>Chlorella protothecoides</i>	<i>Candida 99-125 sp. lipase</i>	Metanol	3:1/ 38 °C, 12 h e 180 rpm	98.2%	(XIONG et al., 2008)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Penicillium expansum</i> lipase (PEL)	Metanol	3:1/ 50 °C e 48 h	90.7%	(LAI et al., 2012)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	Lipase de <i>Burkholderia sp. C20</i>	Metanol	67,93: 1 / teor de água, 71,39% em peso, teor de hexano de solvente, 80,57% em peso, 40 °C, 48 h e 600 rpm	97.3%	(TRAN et al., 2012)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	Lipase de <i>Burkholderia sp. C20</i>	Metanol	12.35:1/ 40 °C, 48 h, e 600 rpm	72.1%	(TRAN et al., 2012)
Lípidos de microalgas de <i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Metanol	3:1/ 35 °C, 12 h, e 200 rpm	90.8%	(GULDHE et al., 2015)
Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Etanol	8:1/ 40 °C e 24 h	68.4%	(BAUTIST A et al., 2015)
Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B	Etanol	8:1/ 40 °C e 24 h	78.2%	(BAUTIST A et al., 2015)

Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	Lipase de <i>Mucor miehei</i>	Etanol	8:1/ 40 °C e 24 h	63.3%	(BAUTISTA et al., 2015)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i>	Lipase GH2	Metanol	3:1 - 5:1/ 30 °C, 24 h e 150 rpm	90.0%	(HUANG et al., 2015)
Lípidos de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i>	Lipase GH2	Etanol	5:1/ 30 °C, 24 h, e 150 rpm	95.0%	(HUANG et al., 2015)
Lípidos de microalgas de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Metanol	11:1/ 35 °C, 72 h, 130 rpm e Co-solvent t-butanol	83.0%	(NAVARRO LÓPEZ et al., 2016)
<i>Spirulina</i> Lípidos de microalgas de <i>Platensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Metanol	3:1/ 40 °C, 24 h, e 150 rpm	64.1%	(RAOUFI; MOUSAVI GARGARI, 2018)
<i>Spirulina p</i> Lípidos de microalgas de <i>Latensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Metanol	3:1/ 40 °C, 48 h, e 150 rpm	87.6%	(RAOUFI; MOUSAVI GARGARI, 2018)

Fonte: MOTA (2021).

As microalgas têm se mostrado uma promissora matéria-prima para a síntese do biodiesel devido ao seu alto potencial na produção de óleo e apresentando maior eficiência que os óleos convencionais (ATHAR; ZAIDI, 2020). Microrganismos fotossintéticos podem desenvolver biomassa de microalgas com luz solar, água e CO₂ de maneira mais eficiente do que as plantas. As microalgas têm alto teor de lipídios, não precisam de terras agrícolas para serem cultivadas e têm um ciclo de crescimento relativamente rápido (AHMAD et al., 2011; ATABANI et al., 2012; FAN; BURTON, 2009; HOSSAIN et al., 2008; LIM; TEONG, 2010; ZHU et al., 2017). Porém, apresentam alguns entraves para serem comercializados, seus altos custos para desenvolver linhas de algas que tenham alto rendimento de óleo, fotobiorreatores

eficientes e em larga escala, e a necessidade de grandes tanques de água doce, são exemplos de problemas a serem resolvidos (AHMAD et al., 2011; ATABANI et al., 2012; FAN; BURTON, 2009; HOSSAIN et al., 2008; LIM; TEONG, 2010; ZHU et al., 2017). Diversos tipos de pesquisas indicam que microalgas podem se desenvolver no gás de combustão e utilizar o gás de efeito estufa como matéria-prima para consumo (FAN; BURTON, 2009; ZHU et al., 2017).

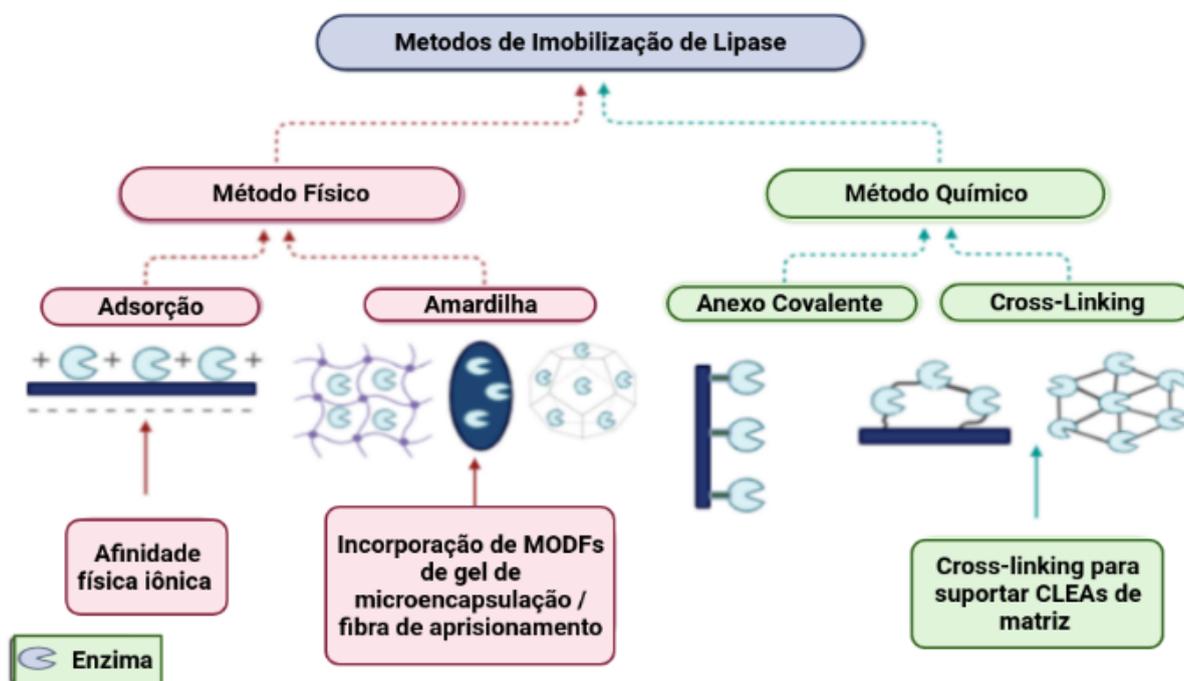
2. Lipases

As lipases (triacilglicerol hidrolases E.C.3.1.1.3) são proteínas lipolíticas biocatalisadoras. Podem ser de origem animal, vegetal e microbiana (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). Catalisam a hidrólise do triacilglicerol (TAG), liberando ácidos graxos livres e glicerol em uma ‘interface’ entre o substrato insolúvel e a fase aquosa (GEOFFRY; ACHUR, 2018; JAVED et al., 2018). Eles também podem sintetizar ou modificar ligações éster entre vários álcoois e ácidos carboxílicos (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018; JAVED et al., 2018; TIWARI et al., 2016; ZHONG et al., 2020). Conseqüentemente, de ativação interfacial, as lipases se manifestam em duas conformações diferentes, formas abertas (ativas) e fechadas (inativas) (BINHAYEEDING et al., 2020; KHAN et al., 2017). Ambientes não homogêneos, o centro ativo de uma abundante de moléculas de lipase são recobertos por uma cadeia polipeptídica, composta por aminoácidos polares na parte externa e aminoácidos apolares na parte interna, em contato com o sítio ativo denominado tampa. As lipases capeadas que cobrem o sítio ativo estão na conformação fechada, isolada do meio de reação (SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2014). O acesso do solvente e o substrato ao sítio ativo são bloqueados e a lipase é inativada. A forma aberta é considerada mais estável do que a forma fechada. Geralmente, a forma aberta das lipases ocorre com o movimento da tampa na presença de superfícies hidrofóbicas apropriadas ou na ‘interface’ do solvente, aumentando a atividade enzimática. No entanto, esse movimento não significa alterar as propriedades finais das lipases, como especificidade e seletividade (CHEN; BLACK; REILLY, 2016; PASCOAL et al., 2018; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2019). Em geral, com base na especificidade, as lipases são divididas em três classes, lipases não específicas, lipases 1,3 específicas e lipases específicas de ácidos graxos. As lipases não específicas catalisam a hidrólise completa de triacilgliceróis, produzem ácidos graxos livres e glicerol (formados por monoacilgliceróis, diacilgliceróis) (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; ZECHNER et al., 2012), semelhante à interesterificação química, e pode remover gordura

ácidos de qualquer posição do substrato (PASCOAL et al., 2018). As lipases 1,3-específicas têm especificidade para ésteres localizados nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis e não podem hidrolisar ligações ésteres em posições secundárias, atuando principalmente na produção de um tipo específico de produto, diferente daqueles formados por lipases não específicas. As lipases de ácidos graxos específicas, no que lhe concerne, têm ação específica na seletividade dos ácidos graxos e catalisam a hidrólise de ésteres constituídos por ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas na posição cis entre C-9 e C-1 (C. WANCURA et al., 2020; JAVED et al., 2018; KAPOOR; GUPTA, 2012; LEE; TANG; LAI, 2012; SCHRECK; GRUNDEN, 2014). Eles também podem catalisar várias reações (CAVALCANTE et al., 2021c, 2021d; DA S. MOREIRA et al., 2021; LUTHIERRE GAMA CAVALCANTE et al., 2021; VALÉRIO et al., 2021), como esterificação, transesterificação (alcoólise e glicerólise) (KUMAR; PAL, 2021; MILANO et al., 2016; YASVANTHRAJAN et al., 2021), e hidrólise de esterificação (AGUIEIRAS et al., 2019), acidólise (ou interesterificação) (SIVAKANTHAN; JAYASOORIYA; MADHUJITH, 2019; UTAMA et al., 2019), aminólise (MOUAD et al., 2016), e lactonização em ambientes não aquosos (KATAYAMA et al., 2017), até mesmo reações promíscuas (BRODZKA et al., 2018).

As lipases pertencem à subclasse II da superfamília α / β -hidrolase (MINDREBO et al, 2016), que envolve uma rede de ligações de hidrogênio em seu sítio ativo de $\alpha\beta$ -hidrolases, que apresentam um padrão de isomerismo conformacional composto por uma sequência de hélices α e folhas pregueadas β (**Figura 11**). Consistindo em uma tríade catalítica fortemente conservada: um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou ácido aspártico), um resíduo de ácido catalítico (ácido aspártico ou glutâmico) e um resíduo de histidina (BINHAYEEDING et al., 2020; FAOUZI et al., 2015; PASCOAL et al., 2018; SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2014).

Figura 11: Métodos de imobilização de enzimas. Os métodos de imobilização enzimática otimizam o processo de reação tornando-o mais sustentável e promissor quando comparado aos catalisadores químicos.



Fonte: MOTA (2021).

Possuem múltiplas propriedades, como massa molecular de 20 a 60 kDa e ponto isoelétrico entre 4 a 5, reconhecem um vasto número de substratos sob temperaturas de 30 a 60 °C, pH extremo (entre 4 a 9), e na meio aquoso ou não convencional. Possuem alta estereosseletividade, estabilidade em solventes orgânicos, facilidade de manipulação genética para as características desejadas, e geralmente dispensam o uso de cofatores (BANSODE; RATHOD, 2017; CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; DWIVEDEE et al., 2017; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; JAVED et al., 2018; YANG et al., 2020).

Em decorrência de sua versatilidade, as lipases são de grande importância no desenvolvimento de biotransformações tecnológicas (CAVALCANTE et al., 2021a; DE OLIVEIRA et al., 2019; LIMA et al., 2017, 2021; MONTEIRO et al., 2021a, 2021b; ROCHA et al., 2021; SOUZA et al., 2020; VALÉRIO et al., 2021; VERDASCO-MARTÍN et al., 2016; VILLALBA et al., 2016), para produção de esferas e diversos setores industriais, como alimentos (laticínios, padaria, confeitaria), detergentes, química fina (síntese de ésteres) e indústrias farmacêuticas (síntese de nutraceuticos, produção de cosméticos, testes biomédicos), tratamento de couro e resíduos (papel e celulose), têxteis, ração animal e biocombustível (ATABANI et al., 2012; BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020;

BOROWIECKI; JUSTYNIAK; OCHAL, 2017; DUMORNE; et al., 2017; LIU; KOKARE, 2017; MOUAD et al., 2016; ORR et al., 2016; RAMNATH; SITHOLE; GOVINDEN, 2017; REHMAN et al., 2017; SHARMA et al., 2017).

2.1. Imobilização de lipase

Embora prevalentes, as lipases apresentam deficiências em alguns parâmetros que as impedem de serem utilizadas em grande escala industrial devido à estabilidade operacional limitada, termoestabilidade, armazenamento e recuperação, alto custo e variações indesejáveis que podem desnaturar a atividade enzimática (MENDES et al., 2011)[230]. Porém, apesar desses entraves, as enzimas têm a vantagem de serem reutilizadas industrialmente em diversos ciclos de reação, sendo sua recuperação no processo essencial para posterior reaproveitamento, tornando-as financeiramente viáveis e competitivas (GUISAN, 2006). Contudo, a recuperação de enzimas livres no meio reacional é complicada, e uma das formas que facilitam a recuperação desses catalisadores é a imobilização de enzimas, que, quando imobilizadas, facilitam o controle dos parâmetros da reação, como a vazão e conveniência do substrato (C. RODRIGUES et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2014; GARCIA-GALAN et al., 2014a, 2014b; HOMAEI, 2015; LIU; CHEN; SHI, 2018; MANOEL et al., 2016; MONTEIRO et al., 2019a; RIOS et al., 2019; RUEDA et al., 2016a, 2016b; WILTSCHI et al., 2020).

A imobilização consiste em prender fisicamente a enzima em uma região do espaço com retenção de suas características catalíticas, permitindo resistência à desnaturação / degradação e agregação, reciclabilidade e reutilização sem perdas significativas (ALBUQUERQUE et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016; RIOS et al., 2016; RUEDA et al., 2016c; SANTOS et al., 2015; SUESCUN et al., 2015). Além disso, não precisa ser pré-tratado ou modificado quimicamente (LIU; CHEN; SHI, 2018). O que torna o processo mais sustentável e promissor quando comparado aos catalisadores químicos é que reduzem a pegada de carbono, são mais baratos e mais diretos (BILAL et al., 2018b; SHELDON; BRADY, 2019; ZHAO et al., 2018).

Nas últimas décadas, a tecnologia de imobilização foi amplamente explorada, mostrando uma variedade de enzimas imobilizadas em diferentes substratos e métodos, como adsorção, ligação covalente, reticulação e encapsulamento (BEZERRA et al., 2020; BILAL et al., 2018a; BONAZZA et al., 2018; CAVALCANTE et al., 2021d; FERNANDEZ-LOPEZ et

al., 2015; FONSECA et al., 2020; GRIGORAS, 2017; L. B. DE OLIVEIRA et al., 2021; MELO et al., 2017; MONTEIRO et al., 2020; VOBĚRKOVÁ et al., 2018). Classificados em métodos físicos (interações monovalentes como hidrofóbica, forças de Van Der Waals, ligação iônica) e químicos (ligação covalente) (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; BRITTON; MAJUMDAR; WEISS, 2018; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). Em condições de grande escala, a fixação física não é muito eficiente, pois é relativamente fraca e não mantém a enzima ligada ao suporte (IRFAN et al., 2019). Portanto, o suporte de imobilização deve ser escolhido de forma adequada para se obter um biocatalisador mais eficiente e estável, reduzindo o custo dos processos de reação em relação às enzimas livres. Vários materiais podem ser usados para apoiar a imobilização de lipases, como partículas magnéticas (PASHANGEH et al., 2017), sílica (CAZABAN; WILSON; BETANCOR, 2016), agarose (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018; NAWAZ et al., 2016), quitosana (ISMAIL; BAEK, 2020; MENDES et al., 2011; SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020) diferentes suportes comerciais, como nanopartículas (BILAL et al., 2018b), resinas (DO NASCIMENTO et al., 2019), biopolímero ou um polímero inorgânico, materiais porosos e outros (IRFAN et al., 2019; MALAR; SEENUVASAN; KUMAR, 2019; PASHANGEH et al., 2017; TACIAS-PASCACIO et al., 2017; TAVANO et al., 2018; ZDARTA et al., 2018). Porém, a seleção adequada de uma matriz está relacionada ao tipo de enzima a ser imobilizada e sua finalidade (BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020). Assim, a matriz deve fornecer um ambiente inerte e biocompatível sem interferir na estrutura nativa sem comprometer a atividade biológica (ZDARTA et al., 2018).

2.1.1. Adsorção

A colagem por adsorção é a técnica mais simples e econômica, não requer ativação do suporte, é realizada em condições moderadas e possibilita a regeneração da matriz utilizada (LIU; CHEN; SHI, 2018). A difusão da enzima que ocorre através da superfície do carreador e a adsorção ao carreador tem apenas duas etapas, permitindo que as enzimas sejam imobilizadas em suportes sólidos através de ligações de baixa energia, como Van Der Waals ou ligações hidrofóbicas, de hidrogênio e iônicas, entre outras (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; GUISAN et al., 2020). O modelo de imobilização é mais favorável para a enzima quanto à preservação do sítio ativo, pois mantém a atividade catalítica por causar pouca ou nenhuma alteração na estrutura. Além disso, é possível recuperar o suporte para posterior reutilização a partir da dessorção da enzima inativa se ela for irreversivelmente desativada

(JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Alguns estudos de imobilização enzimática pelo método de adsorção e em diferentes suportes são relatados na literatura. Arana-Peña et al. (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018), pela primeira vez, apresentou a imobilização de uma lipase comercial (Eversa) em grânulos de octil e agarose aminada e a comparação das propriedades da enzima com as da maioria utilizou lipase, a *isoforma B* de *Candida antarctica*, imobilizada em grânulos de octil agarose, obtendo estabilidade enzimática em todas as condições estudadas de imobilização em grânulos de octil agarose, muito mais do que em suporte de amina, sob uma ampla gama de condições (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018).

Binhayeeding et al. (BINHAYEEDING et al., 2020), avaliaram a combinação da imobilização da lipase de *Candida rugosa* em partículas de polihidroxibutirato (PHB) via adsorção física e glutaraldeído para aumentar a estabilidade térmica, armazenamento e capacidade de reutilização. A enzima imobilizada foi reutilizada com sucesso por 14 ciclos, retendo 50% de sua atividade nas condições ideais de atividade inicial. A atividade máxima observada em pH 9 e 40 °C, indicando que a lipase imobilizada foi mais tolerante ao pH e à temperatura do que a lipase livre (BINHAYEEDING et al., 2020). Kumar e Pal realizaram pesquisas experimentais para produzir biodiesel a partir de uma fonte de carbono renovável de 2.^a geração (KUMAR; PAL, 2021), óleo de semente de laranja, usando biocatalisador de lipase imobilizado com óxido de grafeno efetivamente adsorvido a lipase, proporcionando rendimento de 88% de biodiesel (KUMAR; PAL, 2021).

2.1.2. Ligação covalente

Este método de imobilização depende principalmente da formação de ligações covalentes da enzima com a matriz (suporte) que ocorre através dos materiais carreadores e dos aminoácidos da cadeia lateral da enzima como histidina, arginina, lisina, cisteína ou aspártico ácido e outros. Embora o que define a reatividade seja a presença de diferentes grupos funcionais, como o grupo carboxila, grupo amina, grupo fenólico e grupo sulfídrico. Ao prevenir a inativação de resíduos de aminoácidos no sítio ativo, atividades enzimáticas muito favoráveis podem ser alcançadas, como alta estabilidade enzimática e fixação de lipases ao suporte, garantindo rigidez em sua estrutura (SHARIFI et al., 2019; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Para melhorar a ligação da enzima ao suporte, o uso de reagentes de reticulação como o glutaraldeído é geralmente utilizado na ativação do transportador, pois contém grupos aldeídos que podem interagir com o suporte e, ao mesmo tempo com o grupo amino da enzima possibilitando a ligação covalente formando uma amida que mantém a rigidez da interação (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Algumas estratégias de proteção são amplamente utilizadas, como a presença de substrato ou de um inibidor competitivo na ligação covalente da enzima com a matriz, pela formação de um complexo inibidor de enzima reversível ligado covalentemente, pela incorporação de novos resíduos, obtidos através da ligação covalente de uma enzima solúvel modificada quimicamente à matriz e por um precursor do zimogênio (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Dwivedee et al. (DWIVEDEE et al., 2017), em seu trabalho, relataram a imobilização covalente da lipase de *Pseudomonas fluorescens* em nanotubos de carbono multifolhados funcionalizados com nanobio catalisador em que obteve um aumento de dez vezes na atividade, estabilidade térmica de até 80 °C e oito ciclos de reciclagem. De maneira geral, o nanobio catalisador desenvolvido no estudo tem aplicações para a resolução cinética de compostos racêmicos (DWIVEDEE et al., 2017). Sharifi et al. (SHARIFI et al., 2019), caracterizou e estudou a estabilidade na imobilização da enzima hidrolase organofosforada (OPH) por fixação covalente em microfibras de celulose modificadas usando éter diglicidílico de 1,4-butanodiol (BTDE) e 1,1 - Carbonildiimidazol (CDI) como acoplamento químico, demonstrou alto desempenho no suporte de baixo custo, como aumento da estabilidade do pH das preparações imobilizadas em relação à contraparte livre, rendimentos nos 27 tratamentos com epóxi e CDI de 68,32% e 73,51%, e cerca de 59% e Retenção de 68% de OPH imobilizado em celulose ativada com epóxi e CDI respectivamente, após um ciclo de dez voltas (SHARIFI et al., 2019).

Outro estudo de Malar e colaboradores produziu nanopartículas magnéticas (MNPs) usando a técnica sol-gel, então imobilizou a lipase em MNPs por fixação covalente após modificação de superfície e ativação. Obtendo-se um percentual máximo de imobilização de 92,3%, o que reduziu cargas sucessivas, excelente visto que a temperatura mais elevada foi superior à da lipase livre, a capacidade de reaproveitamento também foi apresentada pelos MNPs ligados à lipase na atividade de ensaio (MALAR; SEENUVASAN; KUMAR, 2019).

2.1.3. Crosslinking

O processo de reticulação ocorre entre enzimas que se ligam entre si, gerando uma rede, sem recurso a suporte (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012; NGUYEN; KIM, 2017; WAHAB et al., 2020), sendo utilizado para melhorar a sua estabilidade através de reticulação intermolecular com o grupo amino e um reagente bifuncional, como o glutaraldeído, que protege a enzima do ambiente externo (LI et al., 2016). As principais formas de obtenção de enzimas imobilizadas livres de suportes são formadas entre um agente de reticulação e preparações com a enzima solubilizada, por cristalização, atomização e agregação (SOUZA et al., 2017; TALEKAR et al., 2013), originando enzimas reticuladas (CLE), cristais de enzima reticulada (CLEC), agregados de enzima reticulada (CLEA), enzima de secagem por pulverização ligada (CSDE) (VRŠANSKÁ et al., 2017; XU et al., 2018). Os benefícios essenciais das enzimas de reticulação são atividade enzimática imensamente catalisada, alta estabilidade e baixo custo de produção devido à ausência de suporte sólido; além da versatilidade, é passível de atingir aplicações enzimáticas mais robustas e estáveis de uso industrial (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). Assim, as ligações cruzadas intramoleculares podem ter efeitos estabilizadores significativos (KHASIM SHARIF; NAGESWARA RAO; JAGADISH, 2020) [293].

Sojitra et al. (SOJITRA; NADAR; RATHOD, 2016), realizaram um estudo com co-imobilização simultânea de três enzimas, amilase, pectinase e celulose, em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com concentração de amino 60mM de glutaraldeído com tempo de reticulação de dez horas para clarificação do suco em um recipiente. O estudo indicou um aumento de mais de duas vezes na meia-vida e maior tolerância para pH mais baixo. Além disso, mesmo após oito ciclos de reutilização consecutivos, as enzimas imobilizadas retiveram até 75% da atividade residual. Por fim, a clarificação dos sucos de maçã, uva e abacaxi com enzima magnética mostrou 41%, 46% e 53%, respectivamente, de redução da turbidez até o tratamento de 150 min (SOJITRA; NADAR; RATHOD, 2016).

Um bom trabalho envolvendo várias estratégias de imobilização enzimática da haloalcano dehalogenase DhaA de *Rhodococcus rhodochrous*, foi desenvolvido por Zheng et al (ZHENG et al., 2019). Esta pesquisa incluiu a adsorção física aconteceu com espuma mesocelular (MCF), reticulação com polietilenoglicol (PEG) de 8 braços e PEGilação com maleimida-tiol. Desse modo, a cristalinidade e a morfologia de MCF foram mantidas, e o DhaA imobilizado (MD-P1-P2) mostrou-se na constante de Michaelis inferior (K_m , 0,588mM) do que DhaA (0,905mM), com uma baixa razão de lixiviação de DhaA (1,1%) de

MCF. E, também apresentou alta estabilidade em condições ambientais extremas (ZHENG et al., 2019). Cunha et al. (CUNHA; FERREIRA; ANGELOTTI, 2020), avaliaram diferentes solventes na precipitação da enzima β -glicosidase produzida por *Aspergillus niger*. Logo, os resultados mais promissores foram a produção de CLEAs com 2-propanol, que proporcionou aumento do teor de proteína e da atividade catalítica no precipitado, permanecendo com 94,4% de atividade residual (CUNHA; FERREIRA; ANGELOTTI, 2020).

Estudos realizados por Pinotti et al. (PINOTTI et al., 2020), investigou se a reticulação intramolecular ocorreu na influência das cadeias glicosídicas β -glicosidase oxidadas e avaliou a influência das cadeias glicosídicas na imobilização da β -glicosidase produzida por *Aspergillus niger*, e se esse efeito aumentaria a estabilidade de enzimas. Seguindo de imobilização em diferentes suportes (DEAE-celulose, glioxil- e epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose), e a estabilidade desses derivados foi analisada. Os resultados mostraram que a reticulação intramolecular foi suficiente e que a estabilização da enzima oxidada foi muito maior que a nativa (glicosilada), e quando realizada em suportes de amino epóxi agarose, a estabilização aumentou em um fator de 6. A estratégia geral de estabilização promoveu 120 vezes estabilização enzimática em relação à enzima solúvel não modificada (PINOTTI et al., 2020).

2.1.4. Encapsulamento

Neste método, não há conexão entre a enzima e o suporte, baseado no aprisionamento físico da enzima em uma rede polimérica geralmente formada por poli(acrilamida), pectina, quitosana, gelatina, alginato, ágar-ágar, carragenina, resinas de poliuretano, silanos e agarose (NAWAZ et al., 2016). Apesar de suas limitações, na segunda etapa de encapsulamento e aprisionamento, ocorre a transferência de massa e a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização (HOMAEI et al., 2013). Eles têm a vantagem de ter uma área de superfície extensa. A probabilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa (MENDES et al., 2011) fornece uma conexão entre enzimas e substrato e melhora a estabilidade mecânica sendo prática e de baixo custo (PANG et al., 2019b).

Assim, moléculas de baixa complexidade, como substrato e produtos, se difundem no meio de reação e entram em contato com o sítio catalítico das enzimas, simultaneamente as moléculas mais complexas, como proteínas (enzimas), que não são capazes de se difundir através parede, são presos no suporte (SOUZA et al., 2017). Em um estudo realizado pela

primeira vez para melhorar a estabilidade, Wang et al. (WANG et al., 2020), abordou a combinação de duas metodologias de adsorção-encapsulação para imobilizar lacase (*Trametes versicolor*) na estrutura híbrida de ZIF-67. Os resultados mostraram a lacase com atividade de armazenamento estável, em pH 3–5, imobilizada em ZIF-67, retendo 88% (15 dias) e 59%, do resíduo da atividade enzimática. Além disso, houve um aumento nos parâmetros termodinâmicos, @ ZIF-67 teve um excelente nível de termoestabilidade do que a lacase livre (WANG et al., 2020). Outro estudo não publicado, Singh et al. (SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020), avaliaram diferentes sistemas de encapsulação com quitosana, alginato e ágar, para a imobilização da glicose isomerase (GI) produzida por *Streptomyces enissocaesilis*, de modo a atingir um encapsulamento mais excelente da enzima e melhorar a atividade. Alcançando os resultados individuais, na imobilização da quitosana, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade GI em 47,18%. O ágar aumentou a atividade GI em 19,7% (faixa alcalina) e maximizou a estabilidade térmica, enquanto o alginato exibiu 18,5% mais atividade do que a enzima solúvel. Assim, o estudo propõe que o IG imobilizado é eficiente em realizar a isomerização em diferentes parâmetros conforme as exigências industriais (SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020).

2.1.5. Imobilização de lipases de microalgas

A produção de biolubrificantes a partir de microalgas tem sido regularmente estudada e relatada na literatura (MAKAREVICIENE; SENDZIKIENE; GAIDE, 2021). Destacam-se as rotas de transesterificação e hidroesterificação, as lipases são utilizadas como catalisadores e a etapa de imobilização é fundamental (THANGARAJ et al., 2019), devido às inúmeras vantagens, como produtos de alta qualidade, baixa demanda de energia, geração mínima de efluentes, e compatibilidade ambiental desse catalisador em relação ao tradicional homogêneo, tornando a produção de biodiesel de microalgas catalisadas por lipase uma alternativa promissora (GULDHE et al., 2016). Bayramoglu et al. (BAYRAMOGLU et al., 2015), biodiesel sintetizado a partir de óleo de microalga *Scenedesmus quadricauda* via reação de transesterificação, catalisadas com *Candida rugosa* lipase e imobilizado em um composto de biossílica-polímero (partículas de sílica diatômica com cadeias poliméricas fibrosas enxertadas), finalmente obtendo um viável e método eficiente de conversão de óleo de algas para a produção de biodiesel via reação de transesterificação enzimática realizada em 85,7% e 96,4% de n-hexano, com enzimas livres e imobilizadas, respectivamente. Assim, a lipase imobilizada era altamente estável e tinha apenas 17% da atividade perdida após seis

ciclos de uso repetido (BAYRAMOGLU et al., 2015). Raoufi e Mousavi Gargari (RAOUFI; MOUSAVI GARGARI, 2018), produziram biodiesel a partir de óleo de microalgas por uma lipase de *Pseudomonas aeruginosa* fundida à proteína Gcw61 ancorada por GPI e exibida com sucesso na superfície de *Pichia pastoris* X 33. Os resultados melhoraram a estabilidade de pH 7–10 e temperatura de 37–40 °C e também foram estáveis em solventes orgânicos hidrofílicos, demonstrando que o biocatalisador de célula inteira exibiu um excelente potencial para a produção de biodiesel a partir de óleo de microalga em lote repetido de 10 ciclos (RAOUFI; MOUSAVI GARGARI, 2018). Em estudos recentes, Da Silva et al. (DA SILVA et al., 2020), avaliaram o óleo microbiano de *Dunaliella salina* como matéria-prima alternativa para a produção de ésteres de ácidos graxos, com potencial aplicação como biolubrificantes a partir de óleo de microalga e óleo combustível utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em Nb₂O₅, que apresentavam propriedades catalíticas e térmicas adequadas, a estabilidade permitiu a conversão do óleo de microalgas nos correspondentes ésteres alquílicos com variação de 70,8 a 89,0% em 120 horas (DA SILVA et al., 2020).

3. Produção de biodiesel de microalgas usando catalisador de lipase

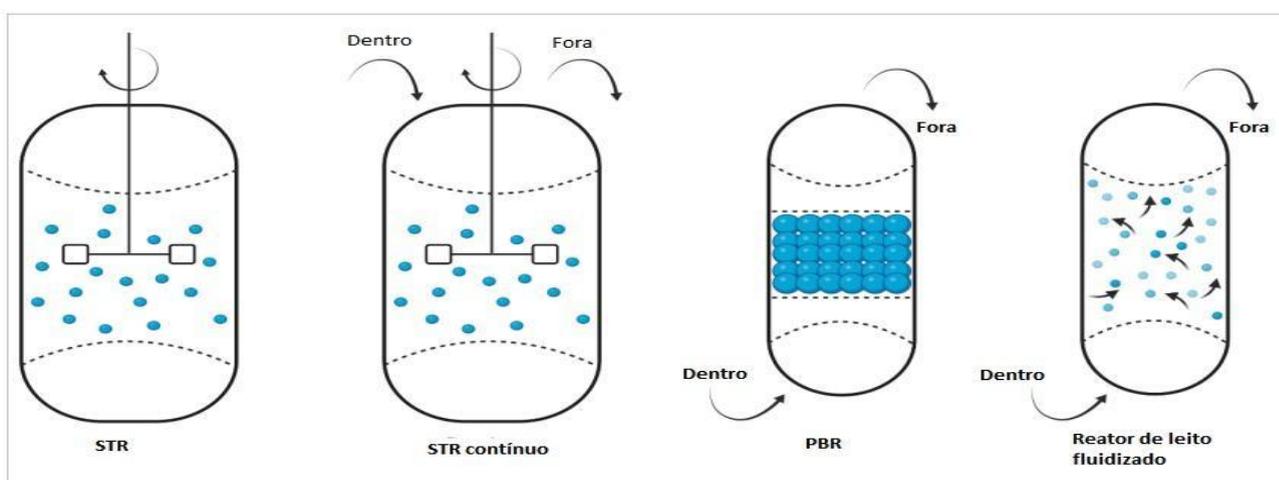
A produção de biodiesel a partir de microalgas corrigidas por lipases apresenta diversas vantagens devido às taxas de crescimento e alto teor de óleo (DICKINSON et al., 2017). Além disso, as microalgas são consideradas produtos de alta qualidade e com baixa necessidade de energia (KATIYAR et al., 2017). Portanto, os processos de catálise enzimática por lipases podem ser influenciados por biorreatores e sistemas de solventes orgânicos, sistemas supercríticos e outros (ISMAIL; AL-ZUHAIR, 2020; ONG et al., 2021; RAOUFI; MOUSAVI GARGARI, 2018).

3.1. Bioreatores

A necessidade de escalonar qualquer processo que lide com catálise enzimática é influenciada, entre outros fatores, pela configuração do biorreator utilizado. Portanto, alguns parâmetros relacionados ao biorreator, como estabilidade operacional, mecânica e térmica da enzima, transferência de massa, recuperação da enzima do meio de reação, mistura do ambiente de reação, solubilidade do álcool e custo de implementação do reator selecionado, devem ser considerados a transferência do processo da escala laboratorial para a escala industrial (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; BALCÃO; PAIVA;

XAVIER MALCATA, 1996; CAVALCANTE et al., 2021b; NORJANNAH et al., 2016). Nesse sentido, existem quatro tipos principais de biorreatores para produção de biodiesel via transesterificação enzimático discutidos na literatura: reatores de coluna de leito fixo, leitos fluidizados, reator de tanque agitado e reator de tanque agitado continuamente (como mostrado na **Figura 12**) (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; BAJAJ et al., 2010; CAVALCANTE et al., 2021b; GUMBA et al., 2016; NORJANNAH et al., 2016; POPPE et al., 2015).

Figura 12: Principais tipos de projeto de reatores. Esferas azuis (enzimas imobilizadas). Biorreatores na produção de microalgas de biodiesel otimizam o processo de reação favorecendo os parâmetros e equilíbrio do sistema para escala industrial.



Fonte: MOTA (2021).

Um tanque A constitui a configuração de STR com controle e medição de temperatura e um sistema de agitação que permite a mistura do meio de reação e um maior contato da enzima com o substrato (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; AMINI et al., 2017; NORJANNAH et al., 2016). No entanto, o sistema STR geralmente requer um longo tempo de reação e, portanto, pode necessitar de grandes volumes de tanques para fornecer as quantidades de biodiesel exigidas pela escala industrial. Uma forma de otimizar o processo é implementar um biorreator STR contínuo (NORJANNAH et al., 2016). Apesar da simplicidade de instalação, operação e manutenção, a implementação do projeto STR no processo industrial é limitada pelo volume relativamente pequeno e pela necessidade de ser esvaziado e limpo antes de iniciar um novo ciclo de reação, além da necessidade de recuperar o biocatalisador (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; NORJANNAH et al., 2016). Desse tipo de agitação do reator pode causar

danos mecânicos à enzima, o que pode causar desnaturação da proteína e, conseqüentemente, diminuir as taxas de conversão (NORJANNAH et al., 2016).

Em sistemas PBR, as enzimas imobilizadas são empacotadas em uma coluna (para não serem dispersas no meio de reação), enquanto os reagentes são forçados a passar por ela. Essa característica proporciona uma maior área de contato entre os reagentes e as enzimas, resultando em um melhor desempenho, embora tenha uma relação menor entre a enzima e o substrato do que outros reatores (AMINI et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2021b; POPPE et al., 2015). Esses sistemas são fáceis de operar, possuem eficiências consideráveis, fácil recuperação de enzimas, portanto, podem ser mais facilmente implementados em escala industrial (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015). Além disso, por não necessitar de agitação mecânica, o processo em reatores PBR causa danos menores às enzimas por cisalhamento, portanto, a estabilidade operacional e a constância catalítica são mantidas por mais tempo, permitindo ciclos consecutivos de reação; além disso, a recuperação do glicerol é feita rapidamente, sem etapas e tratamentos complicados (AMINI et al., 2017). Ao contrário dos sistemas PBR, no FBR, as enzimas imobilizadas são mantidas suspensas, permitindo um fluxo mais uniforme, menos queda de pressão e nenhuma preferência de canal (AMINI et al., 2017; FIDALGO et al., 2016; POPPE et al., 2015). Ao manter essa suspensão, a transferência de massa no FBR é superior à do PBR. Porém, o processo de fluidização do reator pode interferir no processo e resultar em baixos rendimentos. A vazão do equipamento pode ser otimizada para ser mais adequada ao que se deseja alcançar. Nesse sentido, algumas características devem ser observadas: projeto do reator, viscosidade do substrato, velocidade de fluidização e tipo de suporte de imobilização (DICKINSON et al., 2017; FIDALGO et al., 2016; POPPE et al., 2015).

Outro tipo de biorreator para produção de biodiesel, principalmente quando microalgas são utilizadas como matéria-prima, é o biorreator monolítico. Nestes biorreatores, as enzimas são imobilizadas de forma estruturada em suportes inorgânicos ou orgânicos denominados "monólitos" (GUMBA et al., 2016). O uso destes monólitos para apoiar a imobilização enzimática para aplicação em reatores se destaca nas configurações PBR e STR. Nesse sentido, biorreatores monolíticos promovem uma menor queda de pressão, baixa dispersão axial, melhor transferência de massa, alta área de superfície específica, menor custo de implementação e aumento de produção de possibilidade real (AMEUR et al., 2014). Conforme a análise de Gumba et al. (GUMBA et al., 2016), nos últimos anos, biorreatores

monolíticos incorporados à produção de biodiesel de microalgas apresentam notável potencial econômico para aplicação industrial (GUMBA et al., 2016).

Novas estratégias e reatores têm sido desenvolvidos na perspectiva de otimizar a produção de biodiesel a partir de lipídios de microalgas, como a tecnologia de ultrassom aplicada a biorreatores. Sivaramakrishnan e Incharoensakdi desenvolveram uma metodologia para transesterificação direta de *Botryococcus sp.* óleo catalisado por *Candida antarctica* lipase B (CALB) sob irradiação ultrassônica usando carbonato de dimetila (DMC) como reagente de transesterificação e como substrato (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017b). Os dados mostraram que a irradiação ultrassônica proporcionou altas taxas de produção de ésteres metílicos em períodos mais curtos do que a produção sem ultrassom. Com condições otimizadas (5 mL DMC / g, catalisador 10%, água destilada (1%), 50 °C) sob irradiação ultrassônica, o sistema proposto entregou 88% de ésteres metílicos e 2,7% de carbonato de glicerol após 4 horas. Em contraste, sem a incidência de ultrassom, mas com as mesmas condições de reação, apenas 76% da produção de éster metílico foi obtida após 36 horas. Portanto, os pesquisadores concluíram que o método é uma alternativa viável para a produção de biodiesel a partir de microalgas (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017b).

Portanto, fica evidente que o desenvolvimento de biorreatores para produção de biodiesel a partir de microalgas é um campo científico promissor, que permite diversas permutações estratégicas e metodológicas para aumentar a escala de produção.

3.2. Sistemas de Solventes Orgânicos

Na maioria das reações enzimáticas, o uso de solventes é necessário para aumentar a solubilidade dos substratos orgânicos insolúveis em água ou óleo. No entanto, solventes orgânicos podem afetar a estrutura da enzima, alterando seu desempenho catalítico ou desativando-a (MOHAMMADI et al., 2018). Porém, quando se trata de produção de biodiesel catalisada por lipase, os solventes atuam como auxiliares na dissolução do álcool que, por acaso, causaria a desidratação da enzima (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016). Em sistemas isentos de solventes, por exemplo, o uso de etanol ou metanol para a produção de biodiesel seria prejudicial à enzima devido à baixa solubilidade desses álcoois em óleos, sendo que esses álcoois não solubilizados podem desativar a lipase (CAVALCANTE et al., 2021b; NAVARRO LÓPEZ et al., 2016). Estratégias como a adição gradual de álcool e

solventes ao meio de reação são relatadas na literatura (CAVALCANTE et al., 2021b; NAVARRO LÓPEZ et al., 2016).

Em relação à produção catalisada por lipase de biodiesel derivado de óleo de microalgas, o uso de solventes como meio de reação tem duas finalidades: (i) permitir altas taxas de conversão e (ii) garantir a estabilidade da lipase (TAHER; AL-ZUHAIR, 2017). Navarro López et al. (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016), estudaram a produção de ésteres metílicos a partir de lipídios de *Nannochloropsis gaditana* por transesterificação catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae* utilizando t-butanol e hexano como solventes. Os experimentos foram realizados em diferentes concentrações de solvente / óleo de modo a aumentar as taxas de conversão. Segundo o estudo, usando concentrações de t-butanol / óleo variando entre 5 e 10 mL / g, foram detectadas altas conversões e velocidades de reação mais altas. No entanto, um aumento exagerado da concentração de t-butanol / óleo aumenta a viscosidade do meio de reação, dificultando a transferência da massa dos substratos para o sítio da enzima ativa. No caso do hexano como solvente, conversões semelhantes às encontradas com o t-butanol foram obtidas com concentrações de 10, 15 e 20 mL / g. Doses menores desse solvente, como 5mL/g, não beneficiaram o processo, provavelmente porque a quantidade de hexano é insuficiente para solubilizar o metanol e promover transferência de massa com maior facilidade (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016).

Ainda, no estudo realizado por Navarro López (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016), o uso do hexano permitiu inicialmente que o processo tivesse uma velocidade inicial superior à verificada com o t-butanol. Essa alta velocidade inicial observada no hexano pode estar relacionada à compatibilidade da lipase com solventes apolares, ou seja, solventes com altos valores de logP que, por serem hidrofóbicos, mantêm a enzima hidratada, flexível e ativa (TAHER; AL-ZUHAIR, 2017). No entanto, a alta velocidade inicial diminui à medida que a reação ocorre devido à formação de glicerol. Por ser um composto polar, o glicerol não é miscível em hexano e, conseqüentemente, se liga à superfície da lipase, reduzindo a velocidade de reação e a taxa de conversão (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016). Além disso, o metanol como um dos substratos contribuiu para a diminuição da conversão (51,1%) pelo hexano, visto que o álcool utilizado não é solúvel em hidrocarbonetos apolares. No entanto, usando t-butanol, a conversão atingiu cerca de 81%; o resultado foi fortemente influenciado pela miscibilidade do metanol em t-butanol (GULDHE et al., 2016; NAVARRO LÓPEZ et al., 2016; TAHER; AL-ZUHAIR, 2017).

Além disso, corroborando os resultados obtidos por (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016; WU, 2017), que estudou 11 diferentes solventes usados como meio de reação na produção enzimática de biodiesel a partir de lipídios de *Chlorella vulgaris*, nas seguintes condições de reação: 50 mg de óleo de microalgas, 10 mg de *Candida antarctica* lipase imobilizada em resina acrílica, metanol: microalgas = 9: 1 (M / M), 1 mL de solvente, 250 rpm, 9h e 45 °C. Os solventes testados e as conversões alcançadas foram: hexano (51,81%), acetona (53,05%), éter (71,25%), diclorometano (19,78%), t-butanol (79,69%), tetra-hidrofurano (20,78%), acetato de etila (20,66%), éter metil terc-butílico (MTBE) (77,66%), 1-butanol (11,36%), isopropanol (39,19%) e piridina (6,98%). Como pode ser visto, o uso de t-butanol permitiu uma taxa de conversão maior do que a observada com outros solventes. Tais resultados reforçam os dados já disponíveis na literatura científica de que a presença de álcoois graxos, como os butanóis, além de melhorar a transferência de massa dos substratos para as enzimas, protege a lipase da desnaturação e desidratação promovida pelo metanol (NAVARRO LÓPEZ et al., 2016; WU et al., 2017; WU, 2017).

Outro exemplo de uma substância que pode ser usada como solvente no meio de reação e como solvente para a extração de lipídios de microalgas é o carbonato de dimetila (DMC). Conforme a literatura, DMC pode ser usado como um aceitador de grupo acil, solvente de extração de lipídios e meio de reação na transesterificação ou esterificação *in situ* (HE et al., 2018; KIM et al., 2016). Nesse sentido, Kim e colaboradores testaram o DMC incorporando-o tanto na extração de lipídios quanto na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), ou seja, na produção de biodiesel em uma única etapa (esterificação *in situ*) utilizando microalgas heterotróficas, *Aurantiochytrium sp.* KRS101 como matéria-prima e lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435). Os experimentos foram realizados variando o volume de DMC com a massa de microalgas (v/p). Na faixa de 5:1 a 20:1 (v/p), as conversões FAME diminuíram, evidentemente devido à solubilização dos lipídios extraídos em quantidades mais significativas de DMC no meio reacional. Portanto, com base nos dados, a proporção de DMC para biomassa de microalgas de 5:1 (v / p), contribuiu para uma maior conversão de FAME, cerca de 60% (KIM et al., 2016).

Outros solventes que podem ser usados na conversão enzimática do biodiesel a partir de óleos de microalgas e estão sendo disseminados na literatura científica são os fluidos supercríticos (SCFs) e os líquidos iônicos (ILs) (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; TAHER; AL-ZUHAIR, 2017) e será discutido posteriormente. Em suma, a

aplicabilidade dos solventes nas conversões enzimáticas de óleos de microalgas para biodiesel, apesar das melhorias observadas nos rendimentos, é condicionada por fatores como polaridade, estrutura molecular, presença de grupos funcionais, toxicidade, impactos ambientais e preço do solvente. Tais características devem ser consideradas na escolha do solvente que melhor se adequar ao processo desenvolvido (WU et al., 2017).

3.3. Sistemas livres de solventes orgânicos

A produção de biodiesel enzimático pode ser realizada em um solvente orgânico, produzindo uma mistura homogênea e dissolvendo o glicerol, eliminando seus efeitos adversos na atividade enzimática (BABAKI et al., 2015; ZHANG; HYATT; AKOH, 2021). No entanto, existe a necessidade de recuperar mais solvente orgânico, ocorrendo através de processos complicados a jusante que produzem mais água residual do que o custo final aumenta o biodiesel (AGHABABAIE et al., 2020). Além disso, os solventes são tóxicos, inflamáveis, prejudiciais ao meio ambiente e caros (AGHABABAIE et al., 2020; DURAIARASAN et al., 2016). Nesse sentido, é crescente o número de estudos visando otimizar a produção de biodiesel em sistemas livres de solventes.

3.3.1. Reação de transesterificação

A principal barreira para a produção em larga escala de biodiesel a partir de microalgas é a extração de lipídios de microalgas, requer muito consumo de energia, sistemas demorados e solventes (GHASEMI NAGHDI et al., 2016; RANJITH KUMAR; HANUMANTHA RAO; ARUMUGAM, 2015); o uso do ultrassom na extração de lipídios é uma solução apontada na literatura, na próxima seção será apresentado a respeito. Outra solução é a síntese direta através de uma reação de transesterificação, visto que a extração e a transesterificação lipídicas são realizadas em paralelo (CHEN et al., 2015; GRIFFITHS; VAN HILLE; HARRISON, 2010). Tian (TIAN et al., 2016) estudou a combinação de lipases NS81006 para produzir ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e Novozym 435 para sintetizar óleos de microalgas na produção de biodiesel por transesterificação. Observando que durante o primeiro estágio da reação assistida pela lipase NS81006, as taxas de reação dos PUFAs foram muito mais lentas para um comprimento de carbono variando de C14 a C18. Por outro lado, na segunda etapa catalisada pela Novozym 435, ocorreu um aumento significativo na conversão de PUFAs. Este processo pode substituir tanto catalisadores químicos quanto solventes orgânicos, produzindo um biodiesel mais “verde” (TIAN et al., 2016).

Em uma investigação semelhante, Surendhiran (SURENTHIRAN; VIJAY; SIRAJUNNISA, 2014) usou a produção de lipase usando *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737 para converter o biodiesel de óleo de microalga marinha *Chlorella salina* por transesterificação em um sistema livre de solvente (SURENTHIRAN; VIJAY; SIRAJUNNISA, 2014). Os parâmetros (teor de biocatalisador, razão molar (álcool: óleo), teor de água, temperatura, tempo e agitação) foram avaliados para otimizar o rendimento do biodiesel com acetato de metila como aceitador de acila. As condições ótimas foram 1,5g de biocatalisador, proporção 1:12 de acetato de metila para óleo, conteúdo de água de 10% (p / p), temperatura de 40 °C, tempo de reação de 60 h e agitação a 250 rpm; nessa condição, foi possível atingir o rendimento máximo de 85,29% do biodiesel (SURENTHIRAN; VIJAY; SIRAJUNNISA, 2014). A estabilidade do biocatalisador de célula inteira imobilizado foi estudada por dez ciclos de uso repetido e não mostrou perda significativa da atividade da lipase na presença de acetato de metila (SURENTHIRAN; VIJAY; SIRAJUNNISA, 2014).

3.3.2. Reação de Interesterificação

Além da transesterificação, outra reação que vem ganhando destaque na síntese de biodiesel a partir de microalgas em um sistema livre de solvente é a interesterificação (HOSSAIN et al., 2020b; SUBHEDAR; GOGATE, 2016). Em um estudo recente, a lipase isolada de uma bactéria marinha isolada, *Bacillus sp.* 23 (KF220659.1) foi imobilizado em grânulos de alginato de sódio (SURENTHIRAN; SIRAJUNNISA; VIJAY, 2015). Após a interesterificação é realizada a lipase encapsulada como biocatalisador com acetato de metila como doador acila em um sistema livre de solvente (SURENTHIRAN; SIRAJUNNISA; VIJAY, 2015). O efeito de vários parâmetros para a interesterificação (carga enzimática, temperatura, água, razão molar, tempo de reação e agitação) (SURENTHIRAN; SIRAJUNNISA; VIJAY, 2015). Em condições ideais (1,5 g de lipase imobilizada, proporção molar de 1:12 de óleo para acetato de metila, 35 °C, 8% de água, tempo de reação de 60 h, agitação de 250 rpm), 95,68% de conversão foi alcançada (MORAIS JUNIOR et al., 2020). Os grânulos imobilizados retiveram cerca de 90% de sua atividade mesmo após dez ciclos consecutivos, sugerindo uma alteração mínima na relação suporte/enzima (SURENTHIRAN; SIRAJUNNISA; VIJAY, 2015).

Duraiarasan (DURAIARASAN et al., 2016) avaliou a produção direta de biodiesel utilizando óleo extraído de células úmidas da microalga marinha *Chlorella salina* via interesterificação em sistema livre de solvente, catalisada por lipase imobilizada em

nanopartículas magnéticas. O rendimento máximo foi observado como 93,56% em condições otimizadas com os parâmetros padrão (DURAIARASAN et al., 2016). Além disso, a enzima imobilizada manteve 90% de sua atividade inicial, mesmo após 10 ciclos de uso repetido (DURAIARASAN et al., 2016). Os estudos apresentados acima demonstram a eficiência da aplicação da lipase, seja ela imobilizada ou solúvel, na produção de biodiesel de microalgas para o processo de interesterificação em sistemas isentos de solventes. Como o método é econômico e ecológico, nenhum solvente foi envolvido. A tabela a seguir no próximo tópico, apresenta alguns estudos para a produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas em sistemas livres de solventes.

3.3.3. Combi-lipase

A produção de biodiesel por lipases pode apresentar baixas conversões, devido à especificidade das lipases e à complexidade dos substratos produzidos a partir de microalgas, conforme mostrado na **Tabela 5** (MONTEIRO et al., 2021a). Nesse sentido, visando otimizar o processo, são utilizadas combi-lipases com diferentes especificidades, denominadas combi-lipase (ALVES et al., 2014).

Sánchez-Bayo (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2019) otimizou a produção de biodiesel de microalgas por transesterificação enzimática, a conversão das lipases (lipase B de *Candida antarctica* (CALB) e *Pseudomonas cepacia* (PC)) sozinhas e combinadas foi analisada (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2019). Os resultados mostraram que uma combi-lipase 25:75 (CALB: PC) produziu uma conversão significativamente maior em ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs) do que aqueles produzidos por cada biocatalisador independentemente (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2019). A melhor combinação de lipase foi reutilizada por 10 ciclos, rendendo cerca de 80% de sua atividade inicial (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2019).

A conversão mais excelente obtida com a melhor combi-lipase e a alta atividade retida mesmo após 10 ciclos comprovam que essa técnica pode ser aplicada em escala industrial, tanto para a produção de biodiesel com microalga como matéria-prima, quanto qualquer outro óleo.

Tabela 5: Diversos óleos de microalgas usados para produção de biodiesel enzimático em sistemas livres de solventes. A produção de biodiesel por lipases pode apresentar baixas conversões, devido à especificidade das lipases e à complexidade dos substratos produzidos a partir de microalgas (SURENDRHIRAN; SIRAJUNNISA; VIJAY, 2015; TALEKAR et al., 2013).

Microalgas	Fontes de Lipase	Reação Condições	Rendimentos (%)	Referências
Microalgas (<i>Chlorella protothecoides</i>)	<i>Candida sp.</i> 99–125	12h, 40 °C, 75% lipase, 3:1 (metanol: óleo)	98	(LI; XU; WU, 2007)
Microalgas (<i>Chlorella vulgaris</i> ESP31) oil	<i>Burkholderia sp.</i> C20	48h, 40 °C, 7:1 razão molar (metanol: óleo)	97	(HALIM et al., 2011; TRAN et al., 2012)
Microalga (<i>Chlorella protothecoides</i>)	<i>Candida sp.</i> 99–12	38 °C ,30% lipase, 3:1 (metanol: óleo)	98	(XIONG et al., 2008)
Microalgae (<i>Schizochytrium sp.</i>)	<i>Aspergillus niger and Candida antarctica B</i>	8h, 45 °C, 1.5% lipase, 5:1 (metanol: óleo)	95%	(TIAN et al., 2016)
Microalgae <i>N. gaditana</i>	<i>Novozym 435</i>	25 °C, 1.5:1, metanol/óleo, 200 rpm, 1% <i>Novozym 435</i>	92.6 %	(CASTILLO LÓPEZ et al., 2015)
<i>Aurantiochytrium sp.</i>	<i>Novozym435</i>	45 °C, 5: 1 metanol/óleo, 300 rpm, 5% lipase	97%	(CHEN et al., 2010; XIONG et al., 2008)

Fonte: MOTA (2021).

3.4. Sistemas assistidos por ultrassom

A imobilização produz um biocatalisador heterogêneo, gerando uma necessidade de mais energia para uma transferência de massa mais significativa e uma maior taxa de conversão (BANSODE; RATHOD, 2017). Esse problema pode ser superado com a aplicação

da tecnologia de ultrassom (LERIN et al., 2014; WANG et al., 2018). Ultrassom é a energia sonora em frequências acima da faixa audível para humanos (> 20 kHz) e que precisa de meios para se propagar (WANG et al., 2018). Quando o ultrassom passa por um meio líquido, os ciclos consecutivos de compressão e rarefação das ondas sonoras causam vibração mecânica do líquido. Esse processo gera um fenômeno denominado cavitação, que compreende a formação, alargamento e colapso de bolhas, que, quando ocorre próximo à fase limite de dois líquidos imiscíveis, pode proporcionar uma agitação muito eficiente, facilitando a transferência de massa (BANSODE; RATHOD, 2017; LERIN et al., 2014).

O acúmulo de energia ultrassônica ocorre nas bolhas oscilantes, e durante o processo de crescimento e implosão, há um aumento iminente da temperatura e energia locais (cerca de 5000 K) e pressão (cerca de 1000 bar) (WANG et al., 2018). Algumas vantagens do ultrassom em reações catalisadas por enzimas podem ser resumidas em minimizar o tempo de reação, reduzir as quantidades de reagentes, aumentar o rendimento, além de ser uma tecnologia “verde”, e economizar energia (LERIN et al., 2014; SOARES et al., 2020; WANG et al., 2018). A tecnologia de ultrassom pode ser aplicada para otimizar a produção de produtos como biodiesel (MAZANOV et al., 2016), fármacos (CHANDAK; GHOSH; GOGATE, 2020), ésteres (PALUDO et al., 2015), polímeros (BERNARDO; ASCHERI; CARVALHO, 2016), sabores (MONTEIRO et al., 2019b), entre outros.

Porém, altas frequências e potências podem causar a estrutura da enzima, causando a desnaturação desta macromolécula. Por outro lado, baixas frequências e potências não resultarão no efeito de cavitação desejado (LERIN et al., 2014). Nas próximas seções, apresentaremos alguns estudos que utilizaram a técnica de ultrassom para produzir biodiesel a partir de microalgas.

3.4.1. Reação de transesterificação por ultrassom

A extração de lipídios de microalgas é um obstáculo para a produção em larga escala de biodiesel a partir de microalgas, pois requer muito consumo de energia sendo demorado (GOH et al., 2019); a síntese direta é uma solução para esse problema, pois combina extração e transesterificação de lipídios em uma única etapa (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018). Sivaramakrishnan (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017b) estudou a influência de vários parâmetros operacionais (conteúdo de biocatalisador, adição de água, relação solvente / algas,

temperatura e tempo de reação) na transesterificação direta de *Botryococcus sp.*. As reações foram realizadas com e sem ultrassom para comparação (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017b). Sob ultrassom e condições ideais, após 4 horas de reação, o rendimento máximo foi de 88% ésteres metílicos, em comparação com um rendimento máximo de 78% ésteres metílicos, após 36h sem ultrassom (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017b). É notório por diminuir o tempo de reação de 36 para 4 horas. Além de reduzir o tempo de reação, a reação assistida por ultrassom obteve uma conversão mais excelente de 88% a 78% sem ultrassom (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017b).

Em um estudo recente, Fattah (FATTAH et al., 2020), estudou três métodos (ultrassom, Soxhlet e solvente) para extrair óleos de algas de duas variantes diferentes de *Chlorella sp.* e *Spirulina sp.* O maior rendimento de extração foi obtido na reação assistida por ultrassom (9,4% para *Chlorella sp.* e 6,6% para *Spirulina sp.*) Seguida por Soxhlet e processos de extração por solvente (FATTAH et al., 2020). Os processos de ultra-som e extração Soxhlet foram otimizados para maximizar a extração de óleo, visto que a extração com solvente não foi eficaz na extração de lipídios (FATTAH et al., 2020). O ultrassom obteve as maiores conversões (90% de óleo para *Spirulina sp.* e 70% de óleo para *Chlorella sp.*) E, posteriormente, o óleo produzido pela técnica de ultrassom foi transesterificado por 5h com uma lipase imobilizada (*Novozyme 435*) a 40 °C para converter triglicerídeos em éster metílico de ácido graxo e glicerol (FATTAH et al., 2020).

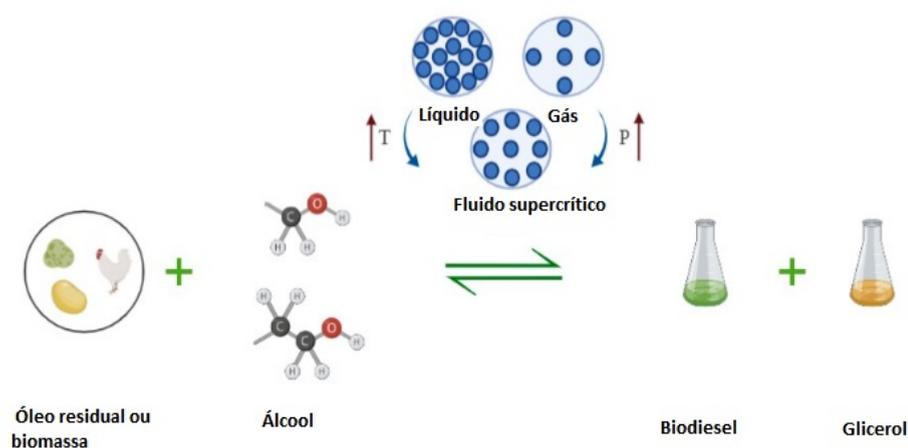
Os resultados dos estudos apresentados acima indicam que a aplicação da irradiação ultrassônica na produção de biodiesel utilizando microalgas como matéria-prima é muito promissora, seja para tornar a extração lipídica mais eficiente ou para diminuir o tempo de reação da reação de transesterificação catalisada por lipase.

3.5. Sistemas Supercríticos

Embora muitos trabalhos científicos explicam tópicos de produção de biodiesel, com o estudo de várias rotas químicas ou enzimáticas e matérias-primas, alguns trabalhos focam a produção de biodiesel em condições supercríticas (CONIGLIO et al., 2014). Fluidos supercríticos (SF) (como mostrado na **Figura 13**) são fluidos em condições físicas acima do valor crítico de pressão e temperatura, usados pela primeira vez como um processo não catalítico para produção e biodiesel por Kusdiana e Saka (KUSDIANA; SAKA, 2001). As

rotas não catalíticas que envolvem a produção de biodiesel por transesterificação com fluidos supercríticos facilitam a separação dos produtos da mistura de reação, permitem a transesterificação simultânea de triglicerídeos e a esterificação de FFA, e apresentam maior eficiência de síntese com menos quantidade de fases (FAROBIE; MATSUMURA, 2017; GÜNAY; TÜRKER; TAPAN, 2019; ONG et al., 2013; SCHWARZ et al., 2010). Além disso, a produção de biodiesel por meio da transesterificação de óleos residuais é facilitada pela água, que possui excelente poder de solubilização na região supercrítica para compostos orgânicos com grandes grupos apolares (DESHPANDE et al., 2010; GÜNAY; TÜRKER; TAPAN, 2019).

Figura 13: Catálise de reação na reação de transesterificação do fluido supercrítico. Rotas não catalíticas envolvendo a produção de biodiesel por transesterificação com fluido supercrítico facilitam a separação de produtos da mistura de reação, permitem a transesterificação de triglicerídeos e esterificação de FFA simultâneas e exibem maior eficiência de síntese com menos fases.



Fonte: MOTA (2021)

Em condições supercríticas não catalíticas para a produção de biodiesel, o processo de pré-tratamento da matéria-prima é eliminado. A extração do óleo de algas e da biomassa das sementes pode ser realizada em uma única etapa com a síntese do biodiesel (MANI RATHNAM; MADRAS, 2019). No entanto, algumas desvantagens são observadas nesta metodologia, como a necessidade de altas razões molares óleo-álcool e altas demandas de energia para o sistema supercrítico de temperatura e pressão (MAMBA et al., 2020). Álcool, óleo, 12, 24 ou 42 proporções e pressões de 10 e 20 Mpa e temperaturas de 473 e 673

K são as mais aplicadas (CONIGLIO et al., 2014). Alguns estudos podem ser constatados na

Tabela 6.

Tabela 6: Algumas aplicações de sistemas supercríticos para produção de biodiesel via modificação lipídica de microalgas. O uso de microalgas em reações de transesterificação com CO₂, metanol, etanol, em valores supercríticos de temperatura e pressão pode otimizar a reação para altos níveis de conversão na produção de biodiesel.

Microalgas	Sistema Supercrítico	Condições de Reação	Conversão de Biodiesel	Referência
<i>Scenedesmus sp.</i>	CO ₂ supercrítico (SC-CO)	47 °C, 4 h, 200 bar, carga de enzima de 35%, proporção molar de metanol: óleo de 9:1	80%	(TAHER et al., 2014)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	CO ₂ supercrítico (SC-CO)	50 °C, 24h, 200 bar, carga de enzima de 30%, proporção molar de metanol: lipídio de 4:1	63%	(TAHER et al., 2011)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Metanol Supercrítico	320K, 31 min, 152 bar, proporção molar de metanol: óleo de 19: 1, teor de água de 7,5% em peso / óleo	90.8±0.93%	(NAN et al., 2015)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Etanol Supercrítico	340 K, 35 min, 170 bar, razão molar de 33: 1 etanol: óleo, 7,5% em peso de conteúdo de água/óleo	87.7±3.48%	(NAN et al., 2015)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	Acetato de etila supercrítico	653 K, 50 min, 20 Mpa, razão molar de 10: 1 (vol./wt.) Etanol: algas	>60%	(MANI RATHNAM; MODAK; MADRAS, 2020)

Fonte: MOTA (2021)

O uso de microalgas em reações de transesterificação com metanol, etanol, carbonato de dimetila e acetato de metila com temperatura e pressão em valores supercríticos pode ser encontrado na literatura. Rathnam and Madras (MANI RATHNAM; MADRAS, 2019) estudaram a transesterificação da microalga *Shizochitrium limacinum* a 518–613 K a 20 Mpa, com uma razão molar variando de 6:1 a 12:1 de metanol / algas. Para esse sistema, 90% da conversão para biodiesel foi observada em 40 minutos (MANI RATHNAM; MADRAS, 2019). A presença de excesso de metanol facilita a reação-difusão com rompimento das paredes celulares das algas, sendo este excesso benéfico para atingir altas taxas de conversão. Da mesma forma, valores mais elevados de temperatura e pressão favoreceram a reação de transesterificação. Como pressão supercrítica, valores acima de 20 Mpa resultaram em um aumento insignificante na conversão.

Por outro lado, algumas aplicações de transesterificação com microalgas que se aproximam das condições supercríticas do metanol sem a maior concentração da razão molar álcool / biomassa das microalgas promovem a maior significância estatística da produção de biodiesel. Dentre eles, o estudo realizado por (MOHAMADZADEH SHIRAZI; KARIMI-SABET; GHOTBI, 2017), que utilizou a matéria-prima da microalga seca *Spirulina platensis*, avaliando a presença de hexano como solvente de reação. A metodologia de superfície de resposta apresentou 32 experimentos, variando o rendimento final do estudo de 0,44 a 99,32% de conversão em FAMES. Segundo a análise ANOVA, os parâmetros de reação que mais impactaram os experimentos foram o tempo de reação, a temperatura e a relação entre o hexano e a massa seca de microalgas. Diferentemente dos demais trabalhos aqui consultados, a razão molar entre álcool e microalgas e o teor de umidade apresentaram os menores índices de significância estatística na metodologia abordada (MOHAMADZADEH SHIRAZI; KARIMI-SABET; GHOTBI, 2017).

No mesmo estudo, foram avaliadas as interações entre os parâmetros de reação. Para tempos de reação acima de 30 minutos, observou-se diminuição na síntese dos FAMES com maior relação metanol/biomassa de microalgas. Isso pode ser explicado pela pressão crítica do sistema com a maior quantidade de metanol, que forma uma mistura de triglicerídeos de fase homogênea de menor densidade (JAZZAR et al., 2015; MOHAMADZADEH SHIRAZI; KARIMI-SABET; GHOTBI, 2017). A presença de hexano na reação também é prejudicial à síntese de biodiesel após mais de 30 minutos, pois o hexano auxilia o metano na extração de lipídios em situações subcríticas, desejáveis apenas nos

minutos iniciais de transesterificação (ABEDINI NAJAFABADI; VOSSOUGH; PAZUKI, 2015). Para promover a síntese de carbonato de glicerol e triacetina, usados como aditivos em polímeros, cosméticos, alimentos e combustíveis, Rathnam e Madras (MANI RATHNAM; MADRAS, 2019) também utilizaram carbonato de dimetila e acetato de metila como agentes metílicos. Conversões acima de 50% foram obtidas usando carbonato de dimetila após 30 minutos, enquanto conversões acima de 40% foram obtidas com acetato de metila após 40 min, ambas as reações a 643K e 20MPa (ILHAM; SAKA, 2010; LAMBA et al., 2017; MANI RATHNAM; MADRAS, 2019; SAKA; ISAYAMA, 2009). Assim, o estudo constatou que, em condições supercríticas para o agente metílico, a transesterificação do óleo de microalgas é favorecida com o metanol, com a energia de ativação (E) da reação $E_{\text{metil acetato}} > E_{\text{dimetil carbonato}} > E_{\text{metanol}}$ (ILHAM; SAKA, 2010; LAMBA et al., 2017; SAKA; ISAYAMA, 2009).

Aghilinategh et al. (AGHILINATEGH; BARATI; HAMADANIAN, 2019) estudaram a produção de biodiesel com transesterificação da microalga *Chlorella vulgaris* na presença de CaO / TiO₂ nano-fotocatalítica e água subcrítica. Neste estudo, TiO₂, CaO / TiO₂ e água para metanol supercrítico somaram o rendimento total do produto a 51,6% e a produção de FAMES a 28,1%. Segundo os autores, o desempenho do sistema subcrítico da água e do metanol supercrítico facilita a difusão da biomassa no meio de reação. Facilita a transferência de massa na superfície do biocatalisador. A presença de CaO com água também facilitou a produção de CH₃O, dado que os íons O²⁻ provocam a liberação de íons H⁺ do metanol e promovem a produção de ânions metóxido, que catalisam a reação de transesterificação (AGHILINATEGH; BARATI; HAMADANIAN, 2019).

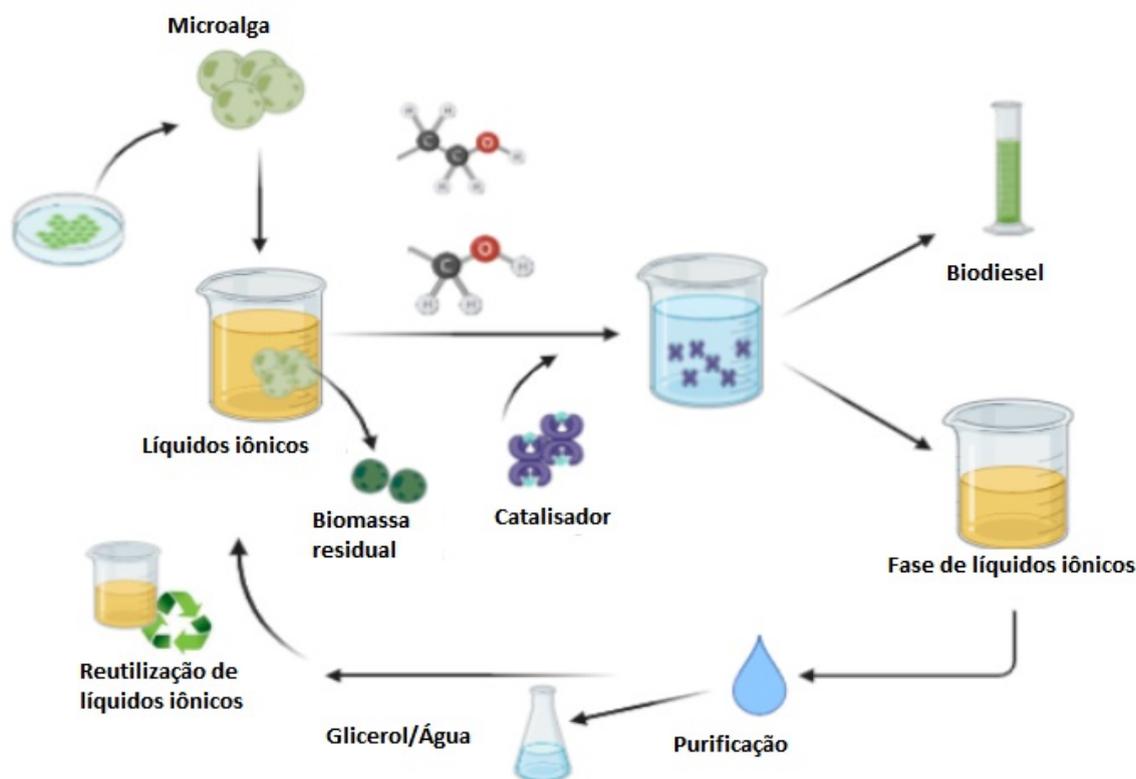
Na produção de biodiesel usando *Nannochloropsis oculata* microalga úmida, o etanol foi estudado na extração lipídica e transesterificação de CO₂ supercrítico em uma única etapa (JAFARI et al., 2021). Conforme o estudo, a adição de água em amostras de microalgas entre 6 a 80% em relação ao peso das microalgas pode diminuir a conversão do biodiesel em 25% (JAFARI et al., 2021). Porém, em altas temperaturas iguais ou superiores a 150 °C, a síntese dos produtos não é anulada pelo teor de água. A otimização da reação foi alcançada com 150 bar, 120 min de reação e 150 °C, obtendo-se 0,253 g de biodiesel por grama de microalga seca. O uso do etanol para extração de óleo de microalgas e como meio de reação para produção de biodiesel também é observado na literatura. Em (JAFARI et al., 2021), a extração do bio-óleo da microalga *Halamphora coffeaeformis* parcialmente seca com etanol obteve maiores rendimentos em comparação com o solvente n-hexano (26% em peso e 21,1%

em peso). A transesterificação dos lipídios com etanol supercrítico ocorreu a 150 bar, a 305 °C em 40 minutos, obtendo-se $56,1 \pm 2,1\%$ de biodiesel por massa de biomassa processada. Com o uso do solvente padrão n-hexano, dadas as mesmas condições de reação, a etanólise supercrítica apresentou valores de conversão entre 35% em peso a 71,7% em peso (JAFARI et al., 2021). Conforme observado em estudos anteriores, o uso de condições supercríticas em reações de transesterificação oferece vantagens empolgantes como a facilidade de separação do produto final, reações com períodos curtos e a não utilização de catalisadores. No entanto, os altos valores dos parâmetros de reação como temperatura, pressão e razão molar óleo/álcool podem inviabilizar economicamente o processo de produção do biodiesel (JAFARI et al., 2021). Assim, estudos utilizando co-solventes também podem ser observados na literatura, o que promove solubilidade entre triglicérides e metanol, tornando a síntese de biodiesel em condições mais amenas (JAFARI et al., 2021). Propano, dióxido de carbono e etano são exemplos de co-solventes.

3.6. Sistemas de Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos (ILs) são sais orgânicos líquidos originados inteiramente de cátions e ânions, que podem ser usados para substituir catalisadores químicos para um processo ambientalmente amigável (TANG; BAKER; ZHAO, 2012; ULLAH et al., 2018). Entre algumas vantagens, os líquidos iônicos apresentam boa estabilidade térmica, dissolvem compostos orgânicos e inorgânicos, facilidade de separação ao final da reação e produtos de alta pureza (LOZANO et al., 2020; ONG et al., 2021; PATRA; SAMANTA, 2012; PIEMONTE et al., 2016). Os ILs podem ser usados como transportadores de enzimas e como o próprio catalisador. Nas reações de transesterificação, os ILs usados como catalisadores são introduzidos em um sistema bifásico, com o biodiesel produzido e os subprodutos da reação de transesterificação, que estão em uma fase inferior, com restos de metanol e líquidos iônicos (CHOI et al., 2014; PIEMONTE et al., 2016). O biodiesel é facilmente separado das outras fases, mas a fase contendo ILs, álcool e glicerol necessita de sucessivas etapas de purificação para ser aplicada na indústria farmacêutica e cosmética (LIU et al., 2012; ULLAH et al., 2018). Finalmente, os ILs são secos e reutilizados em outra reação de transesterificação (como mostrado na **Figura 14**) (WU, 2017).

Figura 14: Uso de Líquidos Iônicos na reação de transesterificação do óleo de microalgas. As reações utilizaram ILs como catalisadores introduzidos em um sistema bifásico, com o biodiesel produzido e os subprodutos da reação de transesterificação, que estão em uma fase inferior com os resíduos de metanol e líquidos iônicos (LIU et al., 2021).



Fonte: MOTA (2021).

Assim, as características únicas dos LIs promovem o uso desses sais como solventes em reações de esterificação de óleos vegetais e transesterificação de gorduras animais residuais (DUPONT, 2011; GUO et al., 2012; LOZANO, 2010). Em alguns estudos, o uso de ILs para dissolver celulose é vantajoso para a extração de óleo de microalgas, promovendo a transesterificação *in situ* de lipídios no biodiesel e a ruptura da parede celular de algas (BAUER et al., 2017; CHOI et al., 2014; LOZANO et al., 2011; ORR et al., 2016; SHANKAR et al., 2017; SUN et al., 2018b). Em outros estudos, as características solúveis em substâncias orgânicas e inorgânicas potencializam o uso de LIs com biocatalisadores para projetar processos bifásicos com maior grau de pureza do produto e biocatalisadores reutilizáveis (LOZANO; BERNAL; VAULTIER, 2011). Logo, (SUN et al., 2018b) -Butil-3-metilimidazólio hidrogenossulfato [Bmim] [HSO₄] foi usado como um catalisador para a reação de transesterificação *in situ* de óleo de microalgas. Para ambas as biomassas de microalgas secas, os aumentos de temperatura iniciais de 100 °C refletiram um aumento na

conversão de 27% em peso a 200 °C. Na reação, a água influenciou negativamente na conversão em FAMES, dado que as moléculas de água competem com os ILS pelas ligações de hidrogênio da celulose, dificultando a dissolução da parede celular das microalgas (SUN et al., 2018b). Além disso, o teor de água pode reduzir a acidez dos ILS, reduzindo a catálise da reação (SUN et al., 2018b). Da mesma forma, o efeito da razão molar [Bmim] [HSO₄]/algas secas foi prejudicial ao rendimento da reação na faixa de 0-0,6 ILS / biomassa de algas. Nesse sentido, pode-se considerar que o aumento de ILS diminui a interação entre metanol e lipídios, pois enquanto o álcool se dissolve em [Bmim] [HSO₄], o mesmo não ocorre com os lipídios (SUN et al., 2018b). Além disso, [Bmim][HSO₄] é incapaz de realizar a transesterificação *in situ* de forma satisfatória, pois não há produção de íons H⁺ com biomassa seca (SUN et al., 2018b).

Embora fosse inicialmente do interesse dos pesquisadores, os TIs ganharam destaque em diversos tipos de pesquisa em torno de 20 anos após o primeiro trabalho. Nas indústrias, o uso de LIs em comparação aos solventes tradicionais só o torna viável devido às reciclagens sucessivas possíveis e ao baixo valor de despejo no meio ambiente (ULLAH et al., 2015, 2018). Dessa forma, as reações de transesterificação para produção de biodiesel com LIs também reduzem os impactos ambientais causados pelo despejo de catalisadores homogêneos, promovendo um processo industrial economicamente benéfico e ecologicamente correto (ULLAH et al., 2018).

4. Desempenho do motor de biodiesel de microalgas

No contexto atual em que o óleo diesel tem sua plena aplicação na sociedade, a busca por soluções de substituição do óleo diesel tem proporcionado expectativas de biocombustíveis sustentáveis (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019; NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014). Devido às instabilidades, o motor movido a biodiesel de microalgas resultará em crescimento econômico, sendo usado como combustível alternativo a partir da biomassa de microalgas, assim utilizado como uma possível saída para a substituição do diesel (KALE; PATLE; KALAMBE, 2021; RAJESH KUMAR; SARAVANAN, 2015; TÜCCAR; ÖZGÜR; AYDIN, 2014). A conversão do motor diesel tem maior eficiência, principalmente a potência do motor, e produz altos níveis de gases poluentes ao meio ambiente (RAJESH KUMAR; SARAVANAN, 2015). Para diminuir os impactos negativos gerados por gases tóxicos, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para reduzir hidrocarbonetos, monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio, por exemplo (KRISHANIA et

al., 2020). Devido às novas tecnologias aplicadas, o biodiesel é uma alternativa para reduzir os impactos desses gases (ISLAM et al., 2015; ISLAM; HEIMANN; BROWN, 2017; RAJAK; VERMA, 2018; WANG et al., 2016).

O biodiesel de terceira geração chama a atenção de diversos pesquisadores, investigado para biodiesel de microalgas com base no padrão de desenvolvimento de diferentes espécies de algas (RAJAK; VERMA, 2018). O solvente hexano é amplamente utilizado para extração de óleo de microalgas pela reação de transesterificação para obtenção de biodiesel (NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014). Logo, o uso de motores de combustão para vários meios, como industrialização, energia, transporte, vem como óleo vegetal, de algodão, de mamona, de linhaça, de cozinha residual, de colza, de palma, de soja, coco e microalgas (NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014; RAJAK; NASHINE; VERMA, 2019a; RAJAK; VERMA, 2018). A variedade de óleos diversos traz as possibilidades de combustíveis alternativos e sustentáveis produzidos a partir da transesterificação dos óleos (RAJAK; NASHINE; VERMA, 2019a). A produção do motor biodiesel a partir das características do motor diesel empregadas da mistura de éster metílico/diesel da Mahua, foram obtidas a partir das misturas de biodiesel aumentadas, e com isso ocorreu uma redução na emissão de monóxido de carbono e hidrocarbonetos (GOZMEN SANLI; ÖZCANLI; SERIN, 2020). Portanto, houve um rápido aumento no consumo de combustível e emissão de NOx quando comparado ao diesel e a taxa de mistura utilizada foi de 20%, aumentando assim a eficiência térmica do motor, embora o consumo específico de energia pelo freio tenha sido reduzido quando comparado ao motor diesel (GODIGANUR; SURYANARAYANA MURTHY; REDDY, 2009; RAJAK; NASHINE; VERMA, 2019a). Essas características do motor a diesel de éster metílico de óleo Mahua foram analisadas em rotação do motor constante (KNEZEVIC et al., 2015).

A mistura de óleo combustível-diesel do B20 é comparada ao diesel em motores a diesel de injeção direta de quatro tempos. Nesse caso, o experimento foi realizado com cargas de 50% e 75% em diferentes rotações do motor. Portanto, a potência e o torque do motor e o consumo específico de combustível (SFC) podem aumentar em cerca de 8% a 75%, e a rotação do motor aumenta, mas o atraso na ignição cai para 7%. Assim, há uma redução na emissão de óxidos de nitrogênio (NOx) e uma redução de 28% na emissão de NOx para B20 a 1.500 rpm em ambas as cargas, além dos aumentos de dióxido de carbono (CO₂) e monóxido (CO) (AWAD et al., 2017; RAJAK; VERMA, 2018). Ao destacar a pesquisa das características da mistura do motor diesel com o biodiesel de soja, comprovou-se o melhor desempenho da mistura B20. Os resultados comprovaram uma redução da fumaça Bosch em

24,35% e na emissão de NO_x em 10,53% em condições de operação (AL-DAWODY; BHATTI, 2013; KARTHIKEYAN et al., 2020).

O comportamento de combustão estudado no motor a biodiesel de microalga prova uma redução significativa na emissão do motor, mas aumentando a emissão de NO_x. Além disso, o efeito da velocidade e carga do motor na queima de biodiesel de algas em um motor a diesel é significativo, pois produz menos torque do que o diesel e maior custo de liberação de calor em comparação com um motor a diesel (ISLAM et al., 2015). Portanto, B10, B20 e B50 sob diferentes condições de carga em um biodiesel de algas com motor cilíndrico poderão ser usados para reduzir a pressão do cilindro e a emissão de torque em 4,5% (PILOTO-RODRÍGUEZ et al., 2017). Portanto, atrasar o tempo de injeção de biodiesel pode melhorar a produção de energia do motor de microalgas. Logo, se o aumento do consumo de combustível específico do freio (BSFC) ocorre devido ao menor valor calorífico, ele reduz significativamente o baixo teor de enxofre (BTE) em 4% em cargas elevadas (HAIK; SELIM; ABDULREHMAN, 2011; WEI; CHEUNG; NING, 2017). Ao considerar os fatores que podem afetar a taxa e a elevação da onda de pressão no cilindro, as análises foram realizadas em um motor PD, óleo de microalga natural e biodiesel, comprovando redução no desempenho do motor e intensificação do ruído do motor (WANG et al., 2016). O desempenho e a emissão do motor PD também foram avaliados usando biodiesel de soja e microalgas (*Chaetoceros gracilis*), levedura e bactérias em condições operacionais limitadas. Onde o efeito nas emissões de escapamento resultou em condições sem carga a 3500 rpm, portanto, o biodiesel de algas testado em um motor a diesel pode ser usado como um biocombustível alternativo em motores de combustão interna (IC) com menos produção de gás espacial durante as emissões (AL-LWAYZY; YUSAF, 2017; LI et al., 2017; RAJAK; NASHINE; VERMA, 2019b, 2020).

O efeito da adição de butanol foi avaliado por testes de motor diesel para as misturas de microalgas biodiesel-diesel. As misturas continham 20% de microalgas de biodiesel em diferentes quantidades de diesel e butanol. Assim, a potência e o torque de saída do motor quando o butanol foi adicionado mostraram-se reduzidos para as misturas de microalgas biodiesel-diesel. Logo, a emissão de gases de escape de CO e NO_x provou melhorias com o resultado do butanol em que o menor valor calorífico (LHV) e a duração da injeção fixa (RAJAK et al., 2020; TÜCCAR; ÖZGÜR; AYDIN, 2014). Com a redução do monóxido de carbono pela adição de butanol, o biodiesel demonstrou maior disponibilidade de oxigênio, devido a essa combustão completa. No entanto, a pesquisa comprovou um aumento nas emissões de NO_x quando misturado com B20 o éster metílico da microalga

devido ao aumento na temperatura de combustão devido à proporção de oxigênio no biodiesel (TÜCCAR; ÖZGÜR; AYDIN, 2014; WANG et al., 2016). O destaque do uso do biodiesel em 100% microalgas no motor diesel não revestido prejudicou os parâmetros de desempenho de potência de frenagem, torque, BTE do motor, consumo específico de combustível do freio (BSFC) e temperatura dos gases de escape. No entanto, a segregação de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e óxidos de nitrogênio (Nox) reduziu quando comparada ao óleo diesel (WEI; CHEUNG; NING, 2017). O uso de óleo cru de microalgas e éster metílico tem propriedades físico-químicas de combustível diesel em que a injeção de combustível causa redução de torque, mas aumenta o ruído do motor diesel. Portanto, o processo de otimização dos parâmetros prejudica o desempenho do petróleo bruto de microalgas (KRISHNA KOLLI et al., 2019).

A cinética química do butanoato de metila pode ser apresentada como característica do biodiesel. Porém, quando se trata de espécies simples, não são consideradas adequadas em características de combustão do biodiesel devido ao comprimento insuficiente da cadeia. Portanto, para resolver este problema, um modelo de oxidação foi desenvolvido combinando misturas de decanoato de metila, 9-decanoato de metila e n-heptano para combinar os combustíveis da relação carbono/hidrogênio/oxigênio (WANG et al., 2016). O uso de misturas álcool-diesel pode discutir questões energéticas e impactos ambientais, dado que os álcoois podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e reduzir os efeitos das emissões gasosas devido à sua composição oxigenada (KARABEKTAS; HOSOZ, 2009). Portanto, motores de ignição por compressão com uso de álcool apresentam diversas dificuldades devido ao baixo nível de cetano, alto calor latente do processo de vaporização, faixa de atraso de ignição, baixa miscibilidade, instabilidade da mistura e baixas propriedades lubrificantes que causam seu uso em motores diesel (CAMPOS-FERNÁNDEZ et al., 2012; KHASIM SHARIF; NAGESWARA RAO; JAGADISH, 2020). Além disso, para superar essas deficiências do motor diesel, diversas técnicas têm sido utilizadas, como as emulsões álcool-diesel, dupla injeção e misturas álcool-diesel. Dessa forma, o uso de álcool tem despertado interesse, pois seus resultados mostram que o butanol-diesel reduz as emissões de fuligem e monóxido (CO) com leve impacto no desempenho do motor diesel (OZSEZEN et al., 2011).

5. Aspectos econômicos do biodiesel microalgas

Estudos de demanda de energia, com foco na apresentação de cenários de evolução do consumo de energia em horizontes de longo prazo, têm sido realizados globalmente para antecipar possíveis inovações e eventos que podem produzir mudanças significativas na sociedade e sua relação com a energia. Segundo o Conselho de Energia (2013), o futuro da energia primária em 2050 mostra que, embora o consumo de combustíveis fósseis ainda seja dominante, as taxas de crescimento serão maiores para as fontes de energia renováveis. Combustíveis derivados de biomassa têm papel importante nesse cenário. Dentre os combustíveis renováveis mais promissores, destaca-se o biodiesel, mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos produzida pela reação de um óleo, ou gordura com álcool na presença de um catalisador (CHANGMAI et al., 2020; FARUQUE; RAZZAK; HOSSAIN, 2020; NORJANNAH et al., 2016). O biodiesel pode ser utilizado puro ou em misturas para motores de ciclo diesel, sendo em alguns aspectos, comparativamente é menos poluente que o diesel (DATTA; MANAL, 2016; PALANI et al., 2020).

A biomassa de microalgas é considerada uma matéria-prima com grande potencial para a produção de biodiesel devido às suas características físico-químicas, semelhantes às dos óleos vegetais (BATISTA et al., 2018; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

Microalgas são organismos aquáticos fotossintéticos unicelulares que usam energia solar para fotossíntese, convertendo energia solar em energia química armazenada (KHAN; SHIN; KIM, 2018; PINNOLA; FORMIGHIERI; BASSI, 2017). Esses microrganismos têm uma enorme capacidade de produzir biomassa por unidade de área e tempo. Diferentes investigações mostram que as microalgas têm o maior potencial para a extração de óleo vegetal para biocombustíveis devido à sua alta densidade lipídica em comparação com sementes oleaginosas, como canola, soja, girassol, etc., conforme mostrado na **Tabela 7**.

Tabela 7: Comparação de microalgas e outras fontes de óleo para produção de biodiesel (Adaptado de MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Os diferentes tipos de óleos mostram que as microalgas apresentam o maior potencial de extração de óleos vegetais para biocombustíveis devido à sua alta densidade lipídica em comparação com as sementes oleaginosas.

Fonte de óleo	Teor de óleo por% de matéria seca	Produção de óleo (L óleo Ha⁻¹ ano⁻¹)	Uso da terra (m² kg biodiesel⁻¹ ano⁻¹)	Produtividade do biodiesel (kg de biodiesel⁻¹ ano⁻¹)
----------------------	--	---	--	---

Milho	44	172	66	152
Cânhamo	33	363	31	321
Milho	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Canola	41	974	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Mamona	48	1307	9	1156
azeite de dendê	36	5366	2	4747
Microalgas (baixo teor de óleo)	30	58700	0.2	51927
Microalgas (teor médio de óleo)	50	97800	0.1	86515
Microalgas (alto teor de óleo)	70	136900	0.1	12110

Fonte: Adapted de MATA; MARTINS; CAETANO, (2010).

Comparando-as com a oleaginosa com maior rendimento de óleo — a palma — há um fator de vantagem de 25 vezes quando as algas são cultivadas em lagoas ou tanques (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2010). Dessa forma, as microalgas poderiam teoricamente produzir mais óleos por hectare e reduzir a escassez de biocombustíveis (BOŠNJAKOVIĆ; SINAGA, 2020). De acordo com Chia et al. (CHIA et al., 2018), as microalgas poderiam idealmente produzir até 150 toneladas de óleo por hectare por ano. Porém, apesar da flexibilidade e da maior produção por área e tempo, um dos maiores impasses na produção de biocombustíveis de microalgas diz respeito à viabilidade econômica (CHIA et al., 2018; KHAN; SHIN; KIM, 2018). Os custos de produção de biodiesel de microalgas são altos e excedem os custos de produção de combustíveis derivados do petróleo e até mesmo do biodiesel produzido a partir de outras matérias-primas (ALISHAH ARATBONI et al., 2019). Em março de 2021, o preço do óleo combustível nos EUA era de cerca de US \$1,16 / litro,

bem abaixo do preço estimado de 10.000 toneladas de microalgas com 30% de lipídios, sendo de cerca de US\$ 2,80/litro, que inclui conversão, impostos, e custos de “marketing” (CHIA et al., 2018).

A análise econômica da produção de biodiesel de microalgas é baseada na estimativa de investimento de capital, custos operacionais e ganhos ou vendas (BRANCO-VIEIRA et al., 2020b). Para alcançar a viabilidade econômica e ambiental, que constitui um dos principais desafios para a implementação de uma refinaria de biocombustíveis de microalgas, é necessário considerar alguns fatores como a disponibilidade de matéria-prima; métodos de menor custo que maximizem a produção são necessários, dado que as etapas de separação das microalgas e extração dos óleos são onerosas devido à alta demanda de energia e aos preços envolvidos; outro fator significativo que afeta a economia do biodiesel de microalgas é a produtividade lipídica das cepas de microalgas utilizadas (COÊLHO et al., 2019; DEPRÁ et al., 2018; KOYANDE et al., 2019; SILVA; BERTUCCO, 2019); além da qualidade do biodiesel de microalgas para atender aos requisitos da norma de combustíveis (HARISKOS; POSTEN, 2014; NAGARAJAN et al., 2013).

O teor de óleo das microalgas é influenciado por parâmetros de crescimento, como fornecimento de nutrientes e condições ambientais (PEDRUZI et al., 2020). A maioria dos lipídios gerados a partir de microalgas estão na forma de triacilgliceróis (NZAYISENGA et al., 2020). Os ácidos graxos presentes nas algas podem ser de cadeia curta e longa, enquanto os ácidos graxos de cadeia curta são ideais para a produção de biodiesel (BATISTA et al., 2018). Portanto, entre os óleos vegetais, a composição de lipídios e triglicerídeos varia, portanto, suas propriedades físico-químicas variam (por exemplo, estabilidade à oxidação). O mesmo ocorreu com o óleo extraído de diferentes microalgas e condições de cultivo variadas (COÊLHO et al., 2019; TAHER et al., 2014), conforme mostrado na **Tabela 8**. Algumas espécies de microalgas, como *Botryococcus sp.*, podem produzir 90% do teor de lipídios por peso da matéria seca (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Tabela 8: Teor de óleo por porcentagem do teor de matéria seca de diferentes espécies de microalgas (Adaptado de (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010) e (CHEN et al., 2018a)). A composição dos diferentes óleos vegetais varia nas taxas de lipídios e triglicerídeos, influenciando suas propriedades físico-químicas.

Espécies de microalgas	Teor de óleo por% de matéria seca	Espécies de microalgas	Teor de óleo por% de matéria seca
-------------------------------	--	-------------------------------	--

<i>Botryococcus</i> sp.	25-90	<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Chlorella protothecoides</i>	23-55	<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Chlorella</i> sp.	28-32	<i>Nannochloropsis</i> sp.	21-68
<i>Chlorella sorokiriana</i>	19-22	<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58	<i>Nitzschia</i> sp.	16-47
<i>Cylindrotheca cohnii</i>	20	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37	<i>Porphyridium cruentum</i>	9-18.8
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55
<i>Dunaliella salina</i>	14-20	<i>Scenedesmus</i> sp.	19-22
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16-71	<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	<i>Spirulina maxima</i>	4-9

<i>Isochrysis</i> sp.	25-33	<i>Spirulina platensis</i>	4-16.6
-----------------------	-------	----------------------------	--------

Fonte: Adaptado de MATA; MARTINS; CAETANO, 2010 e CHEN et al., (2018a)

Franco et al. (FRANCO et al, 2013), explicam que o teor de óleo por porcentagem de matéria seca encontrada em diferentes espécies de algas pode variar entre 1–70% em peso seco, dependendo da seleção das condições de cultivo da linhagem e do estresse ambiental. Segundo os autores, as condições de deficiência de nutrientes e anaerobiose são estrategicamente aplicadas nas lavouras para aumentar a produção de lipídios (FRANCO et al., 2013). Apesar dos valores expressivos no percentual de lipídios de diversas microalgas, é possível aumentar esses valores para auxiliar na viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas (ALISHAH ARATBONI et al., 2019; CHIA et al., 2018). Esse resultado pode ser obtido por meio da aplicação de condições de estresse (deficiência de nutrientes, anaerobiose, temperaturas extremas) durante a fase de crescimento da biomassa das microalgas, que ocorre na segunda fase; na primeira etapa, na fase de cultivo, são necessárias condições adequadas para maximizar o crescimento celular (MIRIZADEH; NOSRATI; SHOJAOSADATI, 2020; SHOKRAVI et al., 2020). A depleção de nitrogênio no cultivo de microalgas produz um aumento na produtividade da biomassa, levando a um aumento na produtividade dos lipídios totais (YAAKOB et al., 2021). A privação de nitrogênio é a estratégia mais comumente utilizada para desencadear o acúmulo de lipídios nas microalgas (CHEN et al., 2011). Isso ocorreu porque, ao aumentar o enriquecimento do ar com CO₂, houve uma ligeira tendência de aumentar tanto o teor de lipídios totais quanto a produtividade em biomassa (CORDEIRO et al., 2017; ELOKA-EBOKA; INAMBAO, 2017). Porém, a produção de lipídios pode ser afetada por fatores ambientais, como temperatura, pH e salinidade (MIRIZADEH; NOSRATI; SHOJAOSADATI, 2020).

Além disso, o processo de produção de biocombustíveis precisa ser simplificado, reduzindo o custo de produção por meio do cultivo e colheita de microalgas mais eficientes para tornar o processo de custo competitivo com combustível à base de petróleo (MISRA et al., 2016; RAWAT et al., 2013). O cultivo de microalgas requer um meio que fornece três macronutrientes: nitrogênio, fósforo e carbono (HAIK; SELIM; ABDULREHMAN, 2011; PILOTO-RODRÍGUEZ et al., 2017). A fonte de carbono, especificamente, depende do metabolismo específico de cada espécie de microalga que pode ser cultivada nos modos autotróficos, heterotrófico e mixotrófico, sendo a diferença entre essas modalidades de cultivo

na fonte de energia e de carbono (COÊLHO et al., 2019). Quando autotróficos, utilizam luz e carbono inorgânico para obter energia química por meio da fotossíntese (WANG; YANG; WANG, 2014). Por meio do carbono orgânico as plantas heterotróficas obtêm energia e carbono. Os mixotróficos utilizam compostos orgânicos e dióxido de carbono e os fotoheterotróficos precisam de luz quando sua fonte de carbono é um composto orgânico (ZHAN; RONG; WANG, 2017).

Também são necessários micronutrientes como sílica, cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobalto, entre outros (CHRISTENSON; SIMS, 2011). Amaro et al. (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011) explicam que uma das causas do alto custo de produção do biodiesel de microalgas advém da necessidade de fornecimento de abundantemente desses nutrientes na fase de cultivo e alto consumo de água (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011). Visando reduzir o custo de produção de biodiesel a partir de microalgas com cultivo heterotrófico, foram consideradas fontes de carbono mais baratas, como gás de combustão, associadas ao uso de águas residuárias (ALISHAH ARATBONI et al., 2019; CHINNASAMY et al., 2010), para nutrientes, como nitrogênio e fósforo. As águas residuais de esgoto residencial, industrial e agrícola, após tratamento prévio (físico e/ou químico), podem ser utilizadas isoladamente ou como aditivo no cultivo de microalgas, o que acabaria por reduzir custos tanto no tratamento de água quanto na produção de biodiesel (COÊLHO et al., 2019; TORRES et al., 2018). Segundo (GOUVEIA et al., 2016), as microalgas liberam oxigênio durante a fotossíntese, que seria utilizado por bactérias no tratamento de efluentes; conseqüentemente, reduzindo os custos de aeração do meio nesse processo (GOUVEIA et al., 2016). O cultivo de microalgas pode ser realizado em diversos tipos de biorreatores, como lagoas abertas (lagoas circulares ou com canais) ou sistemas fechados como fotobiorreatores (PBR) (PINHO et al., 2017; WANG; LAN; HORSMAN, 2012). Esta etapa é importante para a viabilidade do processo, dado que o cultivo adequado resulta em menores custos de implantação/operação e maior produção de biomassa. Da mesma forma, a otimização de processos e a modelagem, e simulação de um biorreator sustentável podem tornar a produção em larga escala mais viável economicamente. Normalmente, os biorreatores requerem altos investimentos em sistemas de controle sofisticados para monitorar o crescimento de microrganismos (GALVANAUSKAS et al., 2019). O cultivo de microalgas em lagoas abertas ou tanques abertos (canal adutor) é mais simples e economicamente viável por apresentarem menores custos de instalação e operação para atender às necessidades do processo de cultivo (COSTA et al., 2019). Nesse sistema, os microrganismos crescem em superfícies rasas, com a disponibilidade de energia solar e oxigênio livre (COSTA et al., 2019). Eles podem ser

construídos de plástico ou concreto com uma pá de agitação que evita que as células se acomodem. O CO₂ necessário pode ser obtido diretamente da atmosfera por aeradores de superfície ou submersos conforme apresentado por (BRENNAN; OWENDE, 2010; DASGUPTA et al., 2010). Tanques abertos são adequados para microalgas sobrevivendo em condições extremas (alto pH e salinidade) ou que crescem rapidamente (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Por outro lado, fotobiorreatores em sistema fechado (PBR), mais adequados para o cultivo de microalgas sensíveis à contaminação, apresentam maiores custos de produção (WANG; LAN; HORSMAN, 2012). A redução do alto custo do PBR em sistema fechado está condicionada ao uso de materiais mais baratos (como o polietileno) ou à aplicação de painéis de auto-sombreamento para permitir maior eficiência fotossintética da cultura (WIJFFELS; BARBOSA, 2010). A recuperação da biomassa de microalgas, que geralmente requer uma ou mais fases de separação de líquidos e sólidos, é uma fase desafiadora do processo de produção de biomassa de microalgas e corresponde a um percentual entre 20% ou 30% dos custos totais de produção (MILLEDGE; HEAVEN, 2013). Os processos envolvidos incluem floculação, filtração, flotação e centrifugação, que requerem muita energia. As baixas densidades celulares (geralmente na faixa de 0,3 a 5 g-l) e o pequeno tamanho de algumas células de microalgas tornam a recuperação da biomassa mais difícil. A seleção da tecnologia de colheita é fundamental para a produção econômica de biomassa de microalgas (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Além disso, outras etapas muito caras no processo de produção de biodiesel de microalgas são a secagem da biomassa e a extração do óleo da microalga (DICKINSON et al., 2017). Segundo Lam e Lee (LAM; LEE, 2012), a ausência de umidade é importante para a reação de extração e transesterificação do óleo (LAM; LEE, 2012). A secagem à luz do sol é considerada um processo simples e barato; no entanto, é lento e requer grandes áreas de secagem, o que pode levar a sujeira e perdas de material (LAM; LEE, 2012). Além disso, essa técnica não seria aplicável em países com invernos longos e altas taxas de chuva (ATNAW; BIN CHE KU YAHYA; JAMA OUMER, 2017). A utilização da secagem da biomassa através do custo do combustível inviabiliza o processo, dado que a energia utilizada para a secagem seria superior à produzida como biodiesel. Da mesma forma, os métodos de liofilização e de prateleira ainda são inviáveis devido ao seu alto custo, o que não permitiria sua aplicação em escala industrial (WIJFFELS; BARBOSA, 2010). Quanto ao método de extração, o processo deve ser rápido e eficiente, além de delicado, de modo a reduzir a degradação de lipídios e triacilglicerol (QUERO-JIMÉNEZ; ARIAS FELIPE; LÓPEZ, 2020). Além disso, os

solventes utilizados devem ser baratos, voláteis (para serem removidos posteriormente), de baixa toxicidade, puros, imiscíveis em água e seletivos (LEE et al., 2010). Existem alguns métodos bem conhecidos de extração de óleo de sementes oleaginosas, como extração por fluido supercrítico, extração enzimática e rota química, que também podem ser aplicados a microalgas (MERCER; ARMENTA, 2011; MORADI-KHEIBARI et al., 2019; XUE et al., 2020; YEN et al., 2015a).

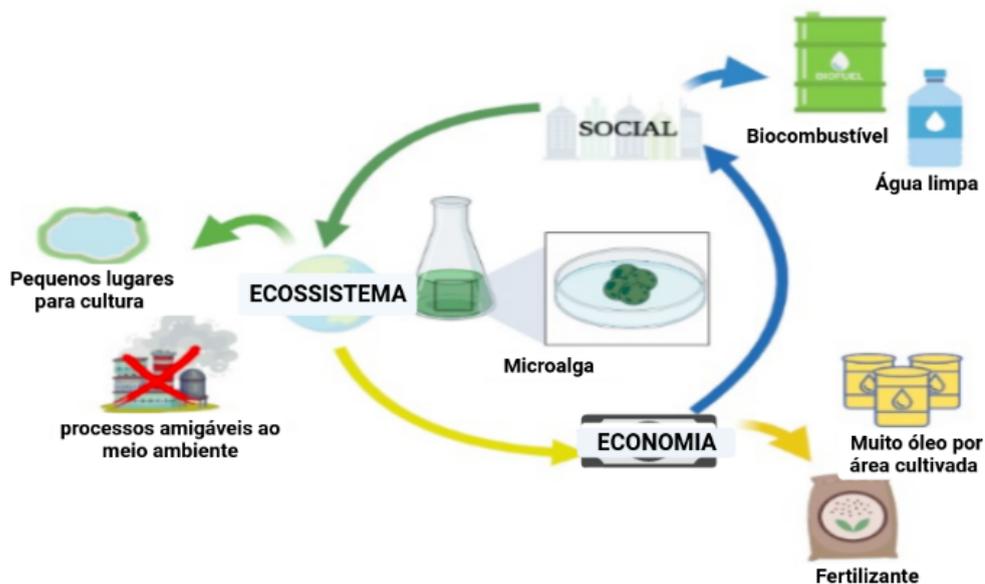
Os processos químicos utilizam solventes orgânicos como hexano, benzeno, etanol, entre outros (RASHID et al., 2014). Apesar da alta eficiência alcançada com a extração química, apresenta como desvantagens a necessidade de excesso de solventes para baixas concentrações de biomassa, altos custos relacionados à recuperação do solvente utilizado e a geração de abundantemente de resíduos. Além de possíveis alterações na composição química das substâncias extraídas (KIM et al., 2013). De acordo com Viguera et al. (VIGUERA et al., 2016), a técnica com fluidos supercríticos permite uma alta seletividade na extração. Esses autores também afirmam que a eficiência está relacionada à temperatura, pressão, tempo de extração e fluxo de fluido (VIGUERA et al., 2016). O fluido supercrítico mais utilizado é o CO₂, devido à temperatura relativamente baixa (31,1 °C) e pressão crítica (72,9 atm) (KHAW et al., 2017). Devido aos altos custos, esta técnica não é aplicável em escala industrial. O uso de enzimas para extração de óleo tem se destacado pela alta eficiência do processo e por não alterar quimicamente os lipídios. A desvantagem são os preços elevados das enzimas comerciais (LAM; LEE, 2012; MAT YUSOFF; GORDON; NIRANJAN, 2015; MWAURAH et al., 2020).

Apesar do grande interesse dos atores econômicos e científicos na produção de biodiesel a partir de microalgas nos últimos anos, ainda há necessidade de ações que possam contribuir com o surgimento do biodiesel para obter viabilidade econômica e se tornar competitivo com os combustíveis convencionais derivados do petróleo. Ser suficientemente econômico ainda é um dos principais desafios para a implementação em larga escala de biocombustíveis a partir de microalgas. Os custos de produção variam significativamente com a escala e o sistema de produção. Entre as ações que podem viabilizar a produção industrial estão investimentos em pesquisa, adoção de biorreatores sustentáveis, mudanças nas políticas públicas que incentivem melhorias tecnológicas ou de processo que reduzam os custos finais de produção, visto que as etapas de separação das microalgas e extração do petróleo são bastante onerosas devido à alta demanda por energia e os custos de capital envolvidos.

6. Aspectos ambientais do biodiesel microalgas

A biomassa de microalgas é uma matéria-prima com grande potencial para a produção de biodiesel (ABOMOHRA et al., 2016; CHEN et al., 2018b; GONG; JIANG, 2011). Conforme mencionado nos tópicos anteriores, possuem alto teor de lipídios, rápida taxa de crescimento e permitem o uso de terras não agricultáveis para o cultivo (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; VAZ et al., 2016). Além disso, eles também têm outras vantagens ambientais, como a mitigação da emissão de CO₂, seu uso potencial no tratamento de águas residuais e sua área de cultivo inferior ao óleo vegetal (AHMAD et al., 2011; AKUBUDE; NWAIGWE; DINTWA, 2019; CHEAH et al., 2015; CHEN et al., 2011; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2019; HO et al., 2011; MAITY et al., 2014). O dióxido de carbono, o gás de efeito estufa mais proeminente, pode ser capturado e assimilado por plantas fotossintéticas, então o cultivo de microalgas a torna uma forma ambiental mais sustentável de mitigação das emissões de dióxido de carbono (CHEAH et al., 2015; HO et al., 2011; MAITY et al., 2014). Normalmente, 1 kg de produção de biomassa de microalgas requer 1,83 kg de CO₂ (RAHEEM et al., 2018). A captura desse gás é um dos desafios ambientais mais críticos hoje para empresas e governos em todo o mundo, é uma alternativa possível é incentivar as indústrias que emitem excesso de combustão de gás durante suas operações a usar microalgas para mitigar seu impacto ambiental e também gerar por produtos com valor agregado em simultâneo (AKUBUDE; NWAIGWE; DINTWA, 2019; OLTRA, 2011).

Figura 15: Análise dos aspectos ambientais do biodiesel microalgas. A análise da produção de biodiesel a partir de microalgas influencia diretamente nos aspectos socioeconômicos e ambientais da escala industrial.



Fonte: MOTA (2021).

Considerando a análise dos aspectos socioeconômicos e ambientais da produção de biodiesel a partir de microalgas, eles podem crescer em água salgada, lodo, contaminada ou residuária em regiões não cultiváveis, áridas e semi-áridas com péssimas condições de cultivo para plantas comuns (**Figure 15**) (AKUBUDE; NWAIGWE; DINTWA, 2019; APEL; WEUSTER-BOTZ, 2015; ARIAS et al., 2018; BUONO et al., 2014; CHIARAMONTI et al., 2015; RUSTEN; SAHU, 2011). Esta é uma característica essencial, dado que a necessidade de nutrientes e água doce é o maior contribuinte para o custo do cultivo de microalgas (FAROOQ et al., 2015; GULDHE et al., 2019; SLADE; BAUEN, 2013). Nesse sentido, o uso de águas residuárias para a produção de biomassa de microalgas vem ganhando interesse (ARIAS et al., 2018; KADIR et al., 2018; RAHEEM et al., 2018). Os nutrientes essenciais da microalga são nitrogênio, fósforo e microelementos encontrados em águas residuais e resíduos líquidos (LI et al., 2020a; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). Assim, as microalgas podem ser utilizadas de forma eficiente para purificação de efluentes, diminuindo a dependência de fertilizantes sintéticos; portanto, reduzindo os custos de cultivo associados (FAROOQ et al., 2015; FARUQUE; RAZZAK; HOSSAIN, 2020; MAKAREVICIENE; SENDZIKIENE; GAIDE, 2021). Utilizou matéria-prima de microalgas cultivadas em água residual para produzir biodiesel com *Candida rugosa* lipase imobilizada como catalisador (GULDHE et al., 2019). Entre os vários modos avaliados, a produtividade lipídica máxima de 57,03 mgL⁻¹d⁻¹ foi alcançada em condições de cultivo mixotrófico usando um centro anaeróbio (GULDHE et al., 2019). Os parâmetros de reação foram otimizados usando metodologia de superfície de resposta, e a melhor conversão de 95,36% foi alcançada a 50 °C, proporção de metanol para óleo de 3:1 e quantidade de enzima de 15% com base no peso do óleo. A lipase de *C. rugosa* imobilizada foi usada para cinco lotes sem muita eficiência de conversão (> 90%) (GULDHE et al., 2019). O biodiesel obtido apresentou a maioria das propriedades conforme as normas ASTM e EN (GULDHE et al., 2019).

Vale ressaltar que a cultura de microalgas pode ter uma gama diversificada de impactos ambientais positivos ou negativos, muitos dos quais são específicos para o local de cultivo (PIRES et al., 2013; SLADE; BAUEN, 2013; UGGETTI et al., 2014; USHER et al., 2014). O impacto do gerenciamento da água é a preocupação essencial para a cultura de microalgas, a água consumida e as emissões para os cursos da água a partir do processo (PIRES et al., 2013; SLADE; BAUEN, 2013; USHER et al., 2014). A manipulação genética é regularmente mencionada como um mecanismo para melhorar a eficiência da produção de algas, mas cepas geneticamente manipuladas podem causar problemas para os ecossistemas

das quais fazem parte (ALLISON A. SNOW, 2012; BEACHAM; SWEET; ALLEN, 2017; CHEN et al., 2017; VERMA; KUILA, 2020). Essa estratégia pode atingir algumas características adicionais com o tempo, como a produção de toxinas potentes, causando alguns efeitos destrutivos no ecossistema circundante (ALLISON A. SNOW, 2012; CHEN et al., 2017). A deficiência de recarga da água subterrânea, a poluição do solo, a poluição da água e as emissões de GEE estão entre os possíveis problemas ambientais (CHEN et al., 2017; VERMA; KUILA, 2020). Assim, é necessário prevenir e monitorar continuamente o ambiente de cultivo de microalgas geneticamente modificadas e políticas públicas para proteger os níveis mínimos permitidos de substâncias poluentes nos corpos d'água (SLADE; BAUEN, 2013; VERMA; KUILA, 2020).

As microalgas podem ser cultivadas de maneira mais rápida e contínua do que as plantas (BENEMANN, 1997; SINGH et al., 2014). Sua biomassa derivada geralmente tem uma concentração de lipídios por área de cultivo por um ano é de 4,5 a 7,5 ton. ha⁻¹ ano⁻¹ to 7.5-ton. ha⁻¹y⁻¹ (RAHEEM et al., 2018). Soja, colza e pinhão-manso têm apenas 0,4-, 0,7- e 4,1-ton. ha⁻¹ ano⁻¹ (RAHEEM et al., 2018). Essa característica poderia diminuir o uso da terra para outras culturas tradicionais, reduzindo as disputas por alimentos como combustível (CAMPBELL; BEER; BATTEN, 2011; FARUQUE; RAZZAK; HOSSAIN, 2020). Após a extração lipídica, a biomassa residual pode ser utilizada como fertilizante, farinha de peixe, biometano e produção de bioetanol (CAMPBELL; BEER; BATTEN, 2011; RAHEEM et al., 2018). A valorização dos subprodutos produzidos é necessária para fins ambientais e econômicos, para melhor competição com as culturas vegetais e cadeias de produção de biodiesel de microalgas de baixo custo (PINTO et al., 2005; WANG; DAI, 2015).

7. Tendências futuras

Apesar das várias vantagens discutidas ao longo desta revisão, os custos associados ao biodiesel de microalgas não são competitivos atualmente com outras matérias-primas (MONDAL et al., 2017; RIZWAN et al., 2018). O relatório do Departamento de Energia e Mudanças Climáticas concluiu que com o preço de produção atual do biodiesel microalgal e o aumento esperado no custo do petróleo, ele só se tornaria um substituto econômico para o diesel de petróleo em 2030 (KRISHANIA et al., 2020). Aqui estão algumas das pesquisas atuais que podem mudar o modelo de produção atual e, possivelmente, reduzir os custos associados. A extração de lipídeos de microalgas úmidas requer maior concentração de solvente para extração, implicando na utilização de reatores de extração maiores e mais

energia para manter seu volume na temperatura adequada e recuperar o solvente (DATTA; MANDAL, 2016; FARUQUE; RAZZAK; HOSSAIN, 2020; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; PALANI et al., 2020). Este processo pode usar 90% do consumo total de energia durante a produção de biodiesel microalgas, portanto, muitos estudos procuram produzir mecanismos mais eficazes de extração de lipídios (CHENG et al., 2011; DALL’OGLIO et al., 2014). No entanto, eles ainda estão em escala de laboratório, e mais estudos são necessários para aplicações industriais de baixo custo (BATISTA et al., 2018; CHENG et al., 2011; PINNOLA; FORMIGHIERI; BASSI, 2017). Entre as abordagens atuais e suas modificações estão a extração de solvente orgânico convencional (por exemplo, extração de Soxhlet, método de Folch), extração de fluido supercrítico, extração por microondas, extração assistida por ultrassom e partição trifásica (TPP) (BOŠNJAKOVIĆ; SINAGA, 2020; CHENG et al., 2011; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2010; PERALTA-RUIZ; GONZÁLEZ-DELGADO; KAFAROV, 2013). Métodos mecânicos e enzimáticos também podem ser aplicados antes da extração de lipídios para romper as células microalgas e aumentar a eficiência de extração (BOŠNJAKOVIĆ; SINAGA, 2020; CHIA et al., 2018; DALL’OGLIO et al., 2014; PINNOLA; FORMIGHIERI; BASSI, 2017).

A nanotecnologia está ganhando grande atenção em vários campos de pesquisa, incluindo biocatálise (COÊLHO et al., 2019; DEPRÁ et al., 2018; NAGARAJAN et al., 2013; SEN GUPTA; SHASTRI; BHARTIYA, 2016; SILVA; BERTUCCO, 2019). Carreadores nanoestruturados podem atingir excelente atividade catalítica para produzir biocatalisadores, aumentar sua estabilidade operacional e facilitar a separação após a reação (COÊLHO et al., 2019; HARISKOS; POSTEN, 2014). Também podem ser produzidos com materiais de baixo custo, o que pode tornar o processo enzimático mais viável economicamente no mercado de biocombustíveis (NZAYISENGA et al., 2020; PEDRUZI et al., 2020). A manipulação genética pode produzir cepas de microalgas com maior teor de lipídios e melhorar a extração de lipídios, mas seu impacto de longo prazo nos ecossistemas deve ser avaliado quanto à segurança ambiental (KHASIM SHARIF; NAGESWARA RAO; JAGADISH, 2020; TAHER et al., 2014).

Tecnologias integradas para aproveitamento total da biomassa e valorização dos impactos ambientais estão presentes para diferentes modelos de biorrefinarias (RIZWAN et al., 2018). Os sistemas de captura de CO₂ e purificação de águas residuais fornecem recursos de baixo custo para microalgas e impactam positivamente o meio ambiente em torno da

produção da planta de biocombustível (KHASIM SHARIF; NAGESWARA RAO; JAGADISH, 2020; TAHER et al., 2014). Além disso, após a extração lipídica, a biomassa pode ser utilizada para a produção de outros biocombustíveis ou como recurso nutritivo para peixes ou solo (MONDAL et al., 2017). O balanço energético positivo, as usinas de biorrefinarias de biodiesel de microalgas que utilizam lipase como catalisadores trazem sustentabilidade e potencial custo-benefício nos próximos anos.

8. Conclusão

Esta revisão destacou as microalgas como uma proposta de inovação biotecnológica na produção de biodiesel. Sendo utilizadas como fontes de energia que podem produzir excesso de lipídios, destacando-se como uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis no setor de energia sustentável. Além disso, apresentam alta eficiência fotossintética, rápido crescimento, alto rendimento e cultivo em áreas não suscetíveis. Com isso, essa pesquisa ressalta os diferentes tipos de microalgas e o seu modo de cultivo que influenciam o sistema de produção de lipídios. Além do mais, as diferentes estratégias aplicadas para a extração de óleo de microalgas têm sido exploradas para obter o aumento da produção de lipídios. Assim, o sistema de produção de microalgas pode ocorrer em sistemas de biorreatores abertos ou fechados. Sendo que, o sistema fechado permite um melhor equilíbrio das condições culturais. No entanto, exige altos custos de implantação e operação.

As condições de aprimoramento para a produção de óleo de microalgas requerem catalisadores biológicos como as lipases para otimizar as reações de transesterificação. As lipases utilizadas por catalisadores biotecnológicos vão atuar em condições específicas como temperatura, pressão e pH. Assim, podem catalisar diversas reações em meio aquoso ou não aquoso em diversas aplicações industriais. Ao destacar o uso de lipases imobilizadas para síntese de biodiesel, os métodos de imobilização permitem o reaproveitamento e otimização de todo o processo, aumentando assim a estabilidade dos solventes orgânicos durante a reação de transesterificação. Considerando o desempenho da biocatálise enzimática, as reações de transesterificação podem ocorrer seletivamente e especificamente sob condições amenas de temperatura, pressão, pH e em meio aquoso. Assim, as reações de transesterificação podem ocorrer a partir de catalisadores enzimáticos, ácidos ou básicos, e em meios heterogêneos ou homogêneos. O uso de catalisadores enzimáticos pode exigir solventes orgânicos ou depender do método de extração utilizado, podendo ocorrer quebra de ligação e extração de lipídios de microalgas. A utilização do solvente ideal depende apenas do método de extração dos lipídios.

No entanto, tanto os solventes polares quanto os apolares podem ser extraídos simultaneamente e convertidos em biodiesel. Portanto, as características dos solventes utilizados nas reações enzimáticas trazem vantagens sobre os fluidos supercríticos. Em particular, lipídios extraídos por CO₂ supercrítico ou co-solvente trazem vantagens em relação a outras técnicas de produção industrial em larga escala.

No entanto, com sistemas líquidos iônicos, as várias reações podem ocorrer em baixos pontos de fusão e podem apresentar um estado líquido à temperatura ambiente e, assim, agir sobre compostos orgânicos ou inorgânicos. Assim, dependendo da aplicação de cada solvente e método de imobilização nas reações de transesterificação, o uso de biomassa de microalgas tem se mostrado promissor na obtenção de combustíveis renováveis. Considerando a perspectiva sustentável e econômica, a atuação dos biocombustíveis aumenta os aspectos tecnológicos no desenvolvimento de novos produtos. O investimento em fontes alternativas para a produção de biocombustíveis é de fundamental importância para atender a demanda atual. Portanto, sua produção pode atender à crescente demanda por energia que, no que lhe concerne, não compromete o abastecimento alimentar. Porém, apesar das vantagens, a produção em larga escala ainda é economicamente viável, exigindo diversos estudos e pesquisas que contemplem a escolha das espécies, cultivo, aprimoramento das tecnologias existentes e desenvolvimento de novas técnicas de produção de biodiesel.

Em suma, destacando os impactos negativos dos combustíveis fósseis na busca por novas alternativas tecnológicas, sustentáveis e econômicas. Desse modo, o óleo de microalgas se mostra como uma fonte promissora de energia sustentável. Sendo que essas alternativas ecologicamente corretas aplicadas a biocombustíveis gerados a partir de microalgas promovem energia limpa. Nesse caso, o biodiesel de microalgas pode ser utilizado puro ou em mistura de motor com ciclo diesel, sendo menos poluente e ambientalmente sustentável. Assim, a produção de biodiesel de microalgas a partir de biocatalisadores de lipase otimiza o desempenho das reações e desperta pesquisas futuras para a geração de biocombustíveis ecologicamente sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, jul. 2012.
- ABEDINI NAJAFABADI, H.; VOSSOUGH, M.; PAZUKI, G. The role of co-solvents in improving the direct transesterification of wet microalgal biomass under supercritical conditions. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 90–96, out. 2015.
- ABOMOHR, A. E.-F. et al. Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 596–606, out. 2016.
- ABOMOHR, A. E.-F.; ALMUTAIRI, A. W. A close-loop integrated approach for microalgae cultivation and efficient utilization of agar-free seaweed residues for enhanced biofuel recovery. **Bioresource Technology**, v. 317, p. 124027, dez. 2020.
- AGHABABAIE, M. et al. Enzymatic biodiesel production from crude *Eruca sativa* oil using *Candida rugosa* lipase in a solvent-free system using response surface methodology. **Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 93–99, 2 jan. 2020.
- AGHILINATEGH, M.; BARATI, M.; HAMADANIAN, M. Supercritical methanol for one pot biodiesel production from *Chlorella vulgaris* microalgae in the presence of CaO/TiO₂ nano-photocatalyst and subcritical water. **Biomass and Bioenergy**, v. 123, p. 34–40, abr. 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, nov. 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574–581, jan. 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, nov. 2015.
- AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584–593, jan. 2011.
- AKUBUDE, V. C.; NWAIGWE, K. N.; DINTWA, E. Production of biodiesel from microalgae via nanocatalyzed transesterification process: A review. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 2, n. 2, p. 216–225, ago. 2019.
- ALASWAD, A. et al. Technologies and developments of third generation biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 1446–1460, nov. 2015.
- ALBUQUERQUE, T. L. DE et al. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the

immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 865–874, jul. 2016.

AL-DAWODY, M. F.; BHATTI, S. K. Optimization strategies to reduce the biodiesel NO_x effect in diesel engines with experimental verification. **Energy Conversion and Management**, v. 68, p. 96–104, abr. 2013.

ALISHAH ARATBONI, H. et al. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 178, 21 dez. 2019.

ALLISON A. SNOW, V. H. S. Genetically Engineered Algae for Biofuels: A Key Role for Ecologists. **BioScience**, v. 62, n. 8, p. 765–768, ago. 2012.

AL-LWAYZY, S. H.; YUSAF, T. Diesel engine performance and exhaust gas emissions using Microalgae *Chlorella protothecoides* biodiesel. **Renewable Energy**, v. 101, p. 690–701, fev. 2017.

ALVES, J. S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **RSC Adv.**, v. 4, n. 14, p. 6863–6868, 2014.

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 1, p. 57–66, set. 2007.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402–3410, out. 2011.

AMEUR, S. BEN et al. Development of a multichannel monolith large-scale enzymatic membrane and application in an immobilized enzymatic membrane reactor. **Journal of Membrane Science**, v. 455, p. 330–340, abr. 2014.

AMINI, Z. et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339–353, jun. 2017.

ANANTHI, V. et al. A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. **Fuel**, v. 284, p. 118965, jan. 2021a.

ANANTHI, V. et al. Impact of abiotic factors on biodiesel production by microalgae. **Fuel**, v. 284, p. 118962, jan. 2021b.

APEL, A. C.; WEUSTER-BOTZ, D. Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 995–1008, 28 jun. 2015.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Eversa Lipase on Octyl Agarose Beads and Preliminary Characterization of Stability and Activity Features. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 511, 2 nov. 2018.

ARIAS, D. M. et al. Integrating microalgae tertiary treatment into activated sludge systems for energy and nutrients recovery from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 513–519, jan. 2018.

ARNOLD, A. A. et al. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ^{13}C solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 1, p. 369–377, jan. 2015.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, maio 2012.

ATHAR, M.; ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalysts, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, p. 104523, dez. 2020.

ATNAW, S. M.; BIN CHE KU YAHYA, C. K. M. F.; JAMA OUMER, A. Development of Solar Biomass Drying System. **MATEC Web of Conferences**, v. 97, p. 01081, 1 fev. 2017.

AWAD, O. I. et al. The effect of adding fusel oil to diesel on the performance and the emissions characteristics in a single cylinder CI engine. **Journal of the Energy Institute**, v. 90, n. 3, p. 382–396, jun. 2017.

BABAKI, M. et al. Effect of water, organic solvent and adsorbent contents on production of biodiesel fuel from canola oil catalyzed by various lipases immobilized on epoxy-functionalized silica as low cost biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 93–99, out. 2015.

BABAKI, M. et al. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 105, p. 465–472, maio 2017.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9–14, jan. 2010.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; XAVIER MALCATA, F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392–416, maio 1996.

BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 503–529, set. 2017.

BARATI, B. et al. Recent progress in genetically modified microalgae for enhanced carbon dioxide sequestration. **Biomass and Bioenergy**, v. 145, p. 105927, fev. 2021.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? **Algal Research**, v. 31, p. 107–115, abr. 2018.

BASHIR, N.; SOOD, M.; BANDRAL, J. D. Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 8, n. 2, p. 254–261, 1 mar. 2020.

BATISTA, A. P. et al. Microalgae as Functional Ingredients in Savory Food Products: Application to Wheat Crackers. **Foods**, v. 8, n. 12, p. 611, 23 nov. 2019.

- BATISTA, F. R. M. et al. Properties of microalgae oil from the species *Chlorella protothecoides* and its ethylic biodiesel. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 4, p. 1383–1394, dez. 2018.
- BAUER, G. et al. Biodiesel via in Situ Wet Microalgae Biotransformation: Zwitter-Type Ionic Liquid Supported Extraction and Transesterification. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1931–1937, 6 fev. 2017.
- BAUTISTA, L. F. et al. Enzymatic Production of Biodiesel from *Nannochloropsis gaditana* Microalgae Using Immobilized Lipases in Mesoporous Materials. **Energy & Fuels**, v. 29, n. 8, p. 4981–4989, 20 ago. 2015.
- BAYRAMOGLU, G. et al. Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 95, p. 12–21, mar. 2015.
- BEACHAM, T. A.; SWEET, J. B.; ALLEN, M. J. Large scale cultivation of genetically modified microalgae: A new era for environmental risk assessment. **Algal Research**, v. 25, p. 90–100, jul. 2017.
- BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. S475–S479, jan. 1997.
- BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. DE. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 739–746, abr. 2016.
- BEZERRA, R. M. et al. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, p. 109560, ago. 2020.
- BILAD, M. R.; ARAFAT, H. A.; VANKELECOM, I. F. J. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1283–1300, nov. 2014.
- BILAL, M. et al. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 893–901, mar. 2018a.
- BILAL, M. et al. “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 278–290, nov. 2018b.
- BILAL, M. et al. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 3, p. 159–182, 4 maio 2019.
- BINHAYEEDING, N. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174–185, ago. 2020.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 ago. 1959.

BONAZZA, H. L. et al. Operational and Thermal Stability Analysis of Thermomyces lanuginosus Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 182–196, 29 jan. 2018.

BOROWIECKI, P.; JUSTYNIAK, I.; OCHAL, Z. Lipase-catalyzed kinetic resolution approach toward enantiomerically enriched 1-(β -hydroxypropyl)indoles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 28, n. 12, p. 1717–1732, dez. 2017.

BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes — matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 3, p. 267–279, set. 1992.

BORRELLI, G.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 1 set. 2015.

BOŠNJAKOVIĆ, M.; SINAGA, N. The Perspective of Large-Scale Production of Algae Biodiesel. **Applied Sciences**, v. 10, n. 22, p. 8181, 18 nov. 2020.

BRANCO-VIEIRA, M. et al. Environmental assessment of industrial production of microalgal biodiesel in central-south Chile. **Journal of Cleaner Production**, v. 266, p. 121756, set. 2020a.

BRANCO-VIEIRA, M. et al. Economic analysis of microalgae biodiesel production in a small-scale facility. **Energy Reports**, v. 6, p. 325–332, dez. 2020b.

BRAR, A. et al. Phycoremediation of textile effluent-contaminated water bodies employing microalgae: nutrient sequestration and biomass production studies. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 12, p. 7757–7768, 1 dez. 2019.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: GUI SAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. p. 15–31.

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, n. 2, p. 557–577, fev. 2010.

BRILMAN, W.; GARCIA ALBA, L.; VENEMAN, R. Capturing atmospheric CO₂ using supported amine sorbents for microalgae cultivation. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 39–47, jun. 2013.

BRITTON, J.; MAJUMDAR, S.; WEISS, G. A. Continuous flow biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 15, p. 5891–5918, 2018.

BRODZKA, A. et al. The mechanistic promiscuity of the enzymatic esterification of chiral carboxylic acids. **Catalysis Communications**, v. 106, p. 82–86, mar. 2018.

- BUCHMANN, L. et al. Adsorption kinetics and foaming properties of soluble microalgae fractions at the air/water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105182, dez. 2019.
- BUONO, S. et al. Functional ingredients from microalgae. **Food Funct.**, v. 5, n. 8, p. 1669–1685, 2014.
- BWAPWA, J. K.; ANANDRAJ, A.; TROIS, C. Possibilities for conversion of microalgae oil into aviation fuel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 1345–1354, dez. 2017.
- C. RODRIGUES, R. et al. Immobilization of Proteins in Poly-Styrene-Divinylbenzene Matrices: Functional Properties and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 1707–1718, 6 ago. 2015.
- C. WANCURA, J. H. et al. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 648–667, 11 jul. 2020.
- CAETANO, N. et al. Influence of cultivation conditions on the bioenergy potential and bio-compounds of *Chlorella vulgaris*. **Energy Reports**, v. 6, p. 378–384, fev. 2020.
- CAMPBELL, P. K.; BEER, T.; BATTEN, D. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 50–56, jan. 2011.
- CAMPOS-FERNÁNDEZ, J. et al. A comparison of performance of higher alcohols/diesel fuel blends in a diesel engine. **Applied Energy**, v. 95, p. 267–275, jul. 2012.
- CARVALHO JÚNIOR, R. M. et al. Microalgae biodiesel via in situ methanolysis. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 11, p. 1418–1427, nov. 2011.
- CASTILLO LÓPEZ, B. et al. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 706–711, jun. 2015.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, v. 288, p. 119577, mar. 2021a.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, v. 288, p. 119577, mar. 2021b.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. **Electrochem**, v. 2, n. 1, p. 149–184, 12 mar. 2021c.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Current Status and Future Perspectives of Supports and Protocols for Enzyme Immobilization. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1222, 11 out. 2021d.
- CAZABAN, D.; WILSON, L.; BETANCOR, L. Lipase Immobilization on Siliceous Supports: Application to Synthetic Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 96–103, 8 dez. 2016.
- CHAI, W. S. et al. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 116236, jan. 2021.

- CHAKRABORTY, S.; DUNFORD, N. T.; GOAD, C. A kinetic study of microalgae, municipal sludge and cedar wood co-pyrolysis. **Renewable Energy**, v. 165, p. 514–524, mar. 2021.
- CHANDAK, S.; GHOSH, P. K.; GOGATE, P. R. Treatment of real pharmaceutical wastewater using different processes based on ultrasound in combination with oxidants. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 137, p. 149–157, maio 2020.
- CHANGMAI, B. et al. Widely used catalysts in biodiesel production: a review. **RSC Advances**, v. 10, n. 68, p. 41625–41679, 2020.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018.
- CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, maio 2015.
- CHEE LOONG, T.; IDRIS, A. Rapid alkali catalyzed transesterification of microalgae lipids to biodiesel using simultaneous cooling and microwave heating and its optimization. **Bioresource Technology**, v. 174, p. 311–315, dez. 2014.
- CHEN, B. et al. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198–1206, nov. 2017.
- CHEN, C.-L. et al. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 179–186, out. 2015.
- CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, jan. 2011.
- CHEN, G. et al. Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 382–389, set. 2010.
- CHEN, H. et al. Rheological properties of microalgae slurry for application in hydrothermal pretreatment systems. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 599–604, fev. 2018a.
- CHEN, J. et al. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336–346, jul. 2018b.
- CHEN, Y.; BLACK, D. S.; REILLY, P. J. Carboxylic ester hydrolases: Classification and database derived from their primary, secondary, and tertiary structures. **Protein Science**, v. 25, n. 11, p. 1942–1953, nov. 2016.
- CHEN, Z. et al. Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–17, 2018c.
- CHENG, C.-H. et al. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10151–10153, nov. 2011.

CHIA, S. R. et al. Analysis of Economic and Environmental Aspects of Microalgae Biorefinery for Biofuels Production: A Review. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 6, p. e1700618, 9 fev. 2018.

CHIARAMONTI, D. et al. Thermochemical Conversion of Microalgae: Challenges and Opportunities. **Energy Procedia**, v. 75, p. 819–826, ago. 2015.

CHINNASAMY, S. et al. Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6751–6760, set. 2010.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, nov. 2015.

CHOI, N. et al. In situ lipase-catalyzed transesterification in rice bran for synthesis of fatty acid methyl ester. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 140–146, set. 2018.

CHOI, S.-A. et al. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. **Renewable Energy**, v. 65, p. 169–174, maio 2014.

CHOJNACKA, A.; GLADKOWSKI, W. Production of Structured Phosphatidylcholine with High Content of Myristic Acid by Lipase-Catalyzed Acidolysis and Interesterification. **Catalysts**, v. 8, n. 7, p. 281, 14 jul. 2018.

CHOJNACKA, K.; . F.-J. M. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 15 dez. 2003.

CHOZHAVENDHAN, S. et al. A review on influencing parameters of biodiesel production and purification processes. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 1–2, p. 1–6, fev. 2020.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 686–702, nov. 2011.

COÊLHO, D. DE F. et al. Microalgae: Cultivation Aspects and Bioactive Compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180343, 2019.

CONIGLIO, L. et al. Biodiesel via supercritical ethanolysis within a global analysis “feedstocks-conversion-engine” for a sustainable fuel alternative. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 43, p. 1–35, ago. 2014.

CORDEIRO, R. S. et al. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2021–2031, 24 jul. 2017.

CORRÊA, P. S. et al. Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 10, 22 dez. 2020.

COSTA, J. A. V. et al. Open pond systems for microalgal culture. In: **Biofuels from Algae**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 199–223.

COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2–9, jan. 2011.

CUNHA, T. M. DA; FERREIRA, C. F. M. L.; ANGELOTTI, J. DE A. F. Avaliação De Agentes Precipitantes Para Produção De Agregados De Ligação Cruzada (Cleas) Da Enzima β -Glicosidase Produzida Por *Aspergillus Niger*/Evaluation of Precipitating Agents for the Production of Cross-Linked Aggregates (Cleas) of the Enzyme β -Gly. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 80538–80545, 2020.

DA S. MOREIRA, K. et al. Taguchi design-assisted Co-immobilization of Lipase A and B from *Candida Antarctica* onto Chitosan: characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 10, p. 223–244, 2021.

DA SILVA, A. P. T. et al. Enzymatic catalysis: An environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, p. 117786, ago. 2020.

DALL’OGLIO, E. L. et al. Use of heterogeneous catalysts in methylic biodiesel production induced by microwave irradiation. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 411–417, 2014.

DASGUPTA, C. N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10218–10238, out. 2010.

DATTA, A.; MANDAL, B. K. A comprehensive review of biodiesel as an alternative fuel for compression ignition engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 799–821, maio 2016.

DE BOER, K. et al. Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1681–1698, 19 dez. 2012.

DE MEDEIROS, V. P. B. et al. Microalgae in the meat processing chain: feed for animal production or source of techno-functional ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 125–134, fev. 2021.

DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts’ Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 10 abr. 2018.

DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 597–608, 3 fev. 2019.

DE SOUZA, T. C. et al. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58–69, ago. 2016.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Biodiesel from Algae. In: **Algae Energy. Green Energy and Technolog**. Green Energy and Technology. London: Springer London, 2010. p. 139–157.

DEPRÁ, M. C. et al. Microalgal Biorefineries for Bioenergy Production: Can We Move from Concept to Industrial Reality? **BioEnergy Research**, v. 11, n. 4, p. 727–747, 28 dez. 2018.

DESHMUKH, S.; KUMAR, R.; BALA, K. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 191, p. 232–247, ago. 2019.

DESHPANDE, A. et al. Supercritical biodiesel production and power cogeneration: Technical and economic feasibility. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1834–1843, mar. 2010.

D'ESTE, M.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. Laminaria digitata as potential carbon source in heterotrophic microalgae cultivation for the production of fish feed supplement. **Algal Research**, v. 26, p. 1–7, set. 2017.

DICKINSON, S. et al. A review of biodiesel production from microalgae. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 19, n. 3, p. 637–668, 18 abr. 2017.

DO NASCIMENTO, M. A. et al. Enhanced Productivity in Glycerol Carbonate Synthesis under Continuous Flow Conditions: Combination of Immobilized Lipases from Porcine Pancreas and Candida antarctica (CALB) on Epoxy Resins. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, p. 860–869, 31 jan. 2019.

D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipid extracts and direct transesterification of the Chlorella pyrenoidosa. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, abr. 2011.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1511–1515, set. 2014.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015.

DUMORNE, K. et al. Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 649–659, 28 abr. 2017.

DUPONT, J. From Molten Salts to Ionic Liquids: A “Nano” Journey. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 11, p. 1223–1231, 15 nov. 2011.

DURAIARASAN, S. et al. Direct conversion of lipids from marine microalga *C. salina* to biodiesel with immobilized enzymes using magnetic nanoparticles. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 1393–1398, mar. 2016.

DWIVEDEE, B. P. et al. Development of nanobiocatalysts through the immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase for applications in efficient kinetic resolution of racemic compounds. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 464–471, set. 2017.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z.; CARRINGTON, G. C. Use of Ultrasound and Co-Solvents to Improve the In-Situ Transesterification of Microalgae Biomass. **Procedia Environmental Sciences**, v. 15, p. 47–55, 2012.

- ELOKA-EBOKA, A. C.; INAMBAO, F. L. Effects of CO₂ sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. **Applied Energy**, v. 195, p. 1100–1111, jun. 2017.
- ENAMALA, M. K. et al. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 49–68, out. 2018.
- ENDALEW, A. K.; KIROS, Y.; ZANZI, R. Heterogeneous catalysis for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil (JCO). **Energy**, v. 36, n. 5, p. 2693–2700, maio 2011.
- FAN, X.; BURTON, R. Recent Development of Biodiesel Feedstocks and the Applications of Glycerol: A Review. **The Open Fuels & Energy Science Journal**, v. 2, n. 1, p. 100–109, 2009.
- FAOUZI, L. et al. Higher tolerance of a novel lipase from *Aspergillus flavus* to the presence of free fatty acids at lipid/water interface. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 9, n. 1, p. 9–17, 30 jan. 2015.
- FAROBIE, O.; MATSUMURA, Y. State of the art of biodiesel production under supercritical conditions. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 63, p. 173–203, nov. 2017.
- FAROOQ, W. et al. Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 73–81, maio 2015.
- FARUQUE, M. O.; RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M. Application of Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production from Microalgal Oil—A Review. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1025, 7 set. 2020.
- FATTAH, I. M. R. et al. Lipid Extraction Maximization and Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Microalgae. **Applied Sciences**, v. 10, n. 17, p. 6103, 2 set. 2020.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418, dez. 2009.
- FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83868–83875, 2015.
- FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl₂. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 48–52, jan. 2016.
- FIDALGO, W. R. R. et al. A fluidized bed reactor as an approach to enzymatic biodiesel production in a process with simultaneous glycerol removal. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 38, p. 217–223, jun. 2016.
- FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2 set. 2019.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, maio 1957.

FONSECA, A. M. DA et al. The use of new hydrogel microcapsules in coconut juice as a biocatalyst system for the reaction of quinine. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 111890, mar. 2020.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1638–1643, out. 1984.

G., M. et al. Advanced Techniques in Soybean Biodiesel. In: **Soybean - Bio-Active Compounds**. [s.l.] InTech, 2013. p. 3–45.

GALVANAUSKAS et al. Practical Solutions for Specific Growth Rate Control Systems in Industrial Bioreactors. **Processes**, v. 7, n. 10, p. 693, 2 out. 2019.

GANESAN, R. et al. A review on prospective production of biofuel from microalgae. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00509, set. 2020.

GARCIA-GALAN, C. et al. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 604–616, abr. 2014a.

GARCIA-GALAN, C. et al. Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 10 jun. 2014b.

GENDY, T. S.; EL-TEMAMY, S. A. Commercialization potential aspects of microalgae for biofuel production: An overview. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 22, n. 1, p. 43–51, jun. 2013.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241–253, abr. 2018.

GHASEMI NAGHDI, F. et al. Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 718–726, 19 nov. 2016.

GODIGANUR, S.; SURYANARAYANA MURTHY, C. H.; REDDY, R. P. 6BTA 5.9 G2-1 Cummins engine performance and emission tests using methyl ester mahua (*Madhuca indica*) oil/diesel blends. **Renewable Energy**, v. 34, n. 10, p. 2172–2177, out. 2009.

GOH, B. H. H. et al. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 59–74, jun. 2019.

GONG, Y.; HUANG, J. Characterization of four untapped microalgae for the production of lipids and carotenoids. **Algal Research**, v. 49, p. 101897, ago. 2020.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 7, p. 1269–1284, 5 jul. 2011.

GOUVEIA, L. et al. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. **Algal Research**, v. 16, p. 167–176, jun. 2016.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 4 fev. 2009.

GOZMEN SANLI, B.; ÖZCANLI, M.; SERIN, H. Assessment of thermodynamic performance of an IC engine using microalgae biodiesel at various ambient temperatures. **Fuel**, v. 277, p. 118108, out. 2020.

GRIFFITHS, M. J.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. **Lipids**, v. 45, n. 11, p. 1053–1060, 5 nov. 2010.

GRIGORAS, A. G. Catalase immobilization—A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 1–20, jan. 2017.

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: [s.l: s.n.]. p. 1–13.

GUISAN, J. M. et al. One-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: Immobilized “Native Enzymes.” In: **Immobilization of Enzymes and Cells**. [s.l: s.n.]. p. 83–92.

GULDHE, A. et al. Biocatalytic conversion of lipids from microalgae *Scenedesmus obliquus* to biodiesel using *Pseudomonas fluorescens* lipase. **Fuel**, v. 147, p. 117–124, maio 2015.

GULDHE, A. et al. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1002–1010, jan. 2016.

GULDHE, A. et al. Biodiesel synthesis from wastewater grown microalgal feedstock using enzymatic conversion: A greener approach. **Fuel**, v. 237, p. 1112–1118, fev. 2019.

GUMBA, R. E. et al. Green biodiesel production: a review on feedstock, catalyst, monolithic reactor, and supercritical fluid technology. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 431–447, 1 set. 2016.

GÜNAY, M. E.; TÜRKER, L.; TAPAN, N. A. Significant parameters and technological advancements in biodiesel production systems. **Fuel**, v. 250, p. 27–41, ago. 2019.

GUO, H. et al. Hydrolysis of cellulose over functionalized glucose-derived carbon catalyst in ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 355–359, jul. 2012.

HAIK, Y.; SELIM, M. Y. E.; ABDULREHMAN, T. Combustion of algae oil methyl ester in an indirect injection diesel engine. **Energy**, v. 36, n. 3, p. 1827–1835, mar. 2011.

HALIM, R. et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178–185, jan. 2011.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, maio 2013.

HAMA, S.; NODA, H.; KONDO, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57–64, abr. 2018.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40–50, fev. 2016.

HARISKOS, I.; POSTEN, C. Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 6, p. 739–752, jun. 2014.

HE, Y. et al. Cost-effective biodiesel production from wet microalgal biomass by a novel two-step enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 583–591, nov. 2018.

HELWANI, Z. et al. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502–1514, dez. 2009.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, A. et al. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 435–444, jun. 2019.

HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; NAVIA, R. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 360–364, fev. 2016.

HO, S.-H. et al. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 189–198, mar. 2011.

HOMAEI, A. Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry. In: **Advances in Food Biotechnology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2015. p. 145–164.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 29 out. 2013.

HOSSAIN, A. B. M. S. et al. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 250–254, 1 mar. 2008.

HOSSAIN, N. et al. Feasibility of microalgae as feedstock for alternative fuel in Malaysia: A review. **Energy Strategy Reviews**, v. 32, p. 100536, nov. 2020a.

HOSSAIN, S. M. Z. et al. Recent Advances in Enzymatic Conversion of Microalgal Lipids into Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 34, n. 6, p. 6735–6750, 18 jun. 2020b.

HUANG, J. et al. Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 47–53, mar. 2015.

HUANG, Y.; CAI, Y.; LAPITSKY, Y. Factors affecting the stability of chitosan/tripolyphosphate micro- and nanogels: resolving the opposing findings. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 29, p. 5957–5970, 2015.

HUSSAIN, F. et al. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 137, p. 110603, mar. 2021.

HUSSEIN, A. K. Applications of nanotechnology in renewable energies—A comprehensive overview and understanding. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 460–476, fev. 2015.

ILHAM, Z.; SAKA, S. Two-step supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2735–2740, abr. 2010.

IM, H. et al. Concurrent extraction and reaction for the production of biodiesel from wet microalgae. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 534–537, jan. 2014.

INDHUMATHI, P.; SYED SHABUDEEN, P. S.; SHOBA, U. S. A Method for Production and Characterization of Biodiesel from Green Micro Algae. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v. 6, n. 5, p. 111–122, 31 out. 2014.

IRFAN, M. et al. Strategies to Reuse Cellulase: Immobilization of Enzymes (Part II). In: M., S. et al. (Eds.). . **Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases. Fungal Biology**. [s.l: s.n.]. p. 137–151.

ISLAM, M. A. et al. Combustion analysis of microalgae methyl ester in a common rail direct injection diesel engine. **Fuel**, v. 143, p. 351–360, mar. 2015.

ISLAM, M. A.; HEIMANN, K.; BROWN, R. J. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1160–1170, nov. 2017.

ISMAIL, A. R.; BAEK, K.-H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1624–1639, nov. 2020.

ISMAIL, M.; AL-ZUHAIR, S. Thermo-responsive switchable solvents for simultaneous microalgae cell disruption, oil extraction-reaction, and product separation for biodiesel production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101667, jul. 2020.

JAFARI, A. et al. New insights to direct conversion of wet microalgae impregnated with ethanol to biodiesel exploiting extraction with supercritical carbon dioxide. **Fuel**, v. 285, p. 119199, fev. 2021.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, jan. 2018.

JAZZAR, S. et al. Direct supercritical methanolysis of wet and dry unwashed marine microalgae (*Nannochloropsis gaditana*) to biodiesel. **Applied Energy**, v. 148, p. 210–219, jun. 2015.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–264, 16 jan. 2008.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 27 ago. 2014.

JEZ, S. et al. Comparative life cycle assessment study on environmental impact of oil production from micro-algae and terrestrial oilseed crops. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 266–275, set. 2017.

KADIR, W. N. A. et al. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 171, p. 1416–1429, set. 2018.

KALE, B. N.; PATLE, S. D.; KALAMBE, S. R. Microalgae biodiesel and its various diesel blends as promising alternative fuel for diesel engines. **Materials Today: Proceedings**, v. 44, p. 2972–2977, 2021.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.

KARABEKTAS, M.; HOSOZ, M. Performance and emission characteristics of a diesel engine using isobutanol–diesel fuel blends. **Renewable Energy**, v. 34, n. 6, p. 1554–1559, jun. 2009.

KARIM, A. et al. Microalgal Cell Disruption and Lipid Extraction Techniques for Potential Biofuel Production. In: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 129–147.

KARMAKAR, B.; DHAWANE, S. H.; HALDER, G. Optimization of biodiesel production from castor oil by Taguchi design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2684–2695, abr. 2018.

KARTHIKEYAN, S. et al. Agricultural tractor engine performance analysis using *Stoechospermum marginatum* microalgae biodiesel. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 3438–3442, 2020.

KATAYAMA, M. et al. Hydration-aggregation pretreatment for drastically improving esterification activity of commercial lipases in non-aqueous media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 105, p. 30–37, out. 2017.

KATIYAR, R. et al. Microalgae: An emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 1083–1093, maio 2017.

KHAN, F. I. et al. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, 9 mar. 2017.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 36, 5 dez. 2018.

KHASIM SHARIF, SHAIK.; NAGESWARA RAO, B.; JAGADISH, D. Computational fluid dynamic analysis of Nodularia Spumigena Microalgae Biodiesel and Karanja biodiesel blends using ANSYS in CI engine. **Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 1812–1820, 2020.

KHAW, K.-Y. et al. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1186, 14 jul. 2017.

KIM, B.; IM, H.; LEE, J. W. In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 421–425, jun. 2015.

KIM, J. et al. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 862–876, nov. 2013.

KIM, K. H. et al. Lipase-catalyzed in-situ biosynthesis of glycerol-free biodiesel from heterotrophic microalgae, *Aurantiochytrium* sp. KRS101 biomass. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 472–477, jul. 2016.

KIM, S. et al. Design optimization of large-scale attached cultivation of *Ettlia* sp. to maximize biomass production based on simulation of solar irradiation. **Applied Energy**, v. 279, p. 115802, dez. 2020.

KNEZEVIC, D. et al. The characteristics of combustion process of diesel engine using vegetable oil methyl esters. **Thermal Science**, v. 19, n. 6, p. 2255–2263, 2015.

KOYANDE, A. K. et al. Bio-processing of algal bio-refinery: a review on current advances and future perspectives. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 574–592, 1 jan. 2019.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, ago. 2004.

KRISHANIA, N. et al. Effect of microalgae, tyre pyrolysis oil and *Jatropha* biodiesel enriched with diesel fuel on performance and emission characteristics of CI engine. **Fuel**, v. 278, p. 118252, out. 2020.

KRISHNA KOLLI, V. et al. Establishment of lower exhaust emissions by using EGR coupled low heat loss diesel engine with fuel blends of microalgae biodiesel-oxygenated additive DEE-antioxidant DPPD. **Thermal Science and Engineering Progress**, v. 13, p. 100401, out. 2019.

KUMAR, R.; GHOSH, A. K.; PAL, P. Synergy of biofuel production with waste remediation along with value-added co-products recovery through microalgae cultivation: A review of membrane-integrated green approach. **Science of The Total Environment**, v. 698, p. 134169, jan. 2020.

KUMAR, R.; PAL, P. Lipase immobilized graphene oxide biocatalyst assisted enzymatic transesterification of *Pongamia pinnata* (Karanja) oil and downstream enrichment of biodiesel by solar-driven direct contact membrane distillation followed by ultrafiltration. **Fuel Processing Technology**, v. 211, p. 106577, jan. 2021.

- KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 134–144, ago. 2011.
- KUSDIANA, D.; SAKA, S. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. **Fuel**, v. 80, n. 5, p. 693–698, abr. 2001.
- L. B. DE OLIVEIRA, A. et al. Lipases Immobilized onto Nanomaterials as Biocatalysts in Biodiesel Production: Scientific Context, Challenges, and Opportunities. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 4, p. 875–891, 2021.
- LAI, J.-Q. et al. Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalysts for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2058–2063, dez. 2012.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673–690, maio 2012.
- LAMBA, N. et al. Biodiesel synthesis from *Calophyllum inophyllum* oil with different supercritical fluids. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 767–774, out. 2017.
- LEE, J.-Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S75–S77, jan. 2010.
- LEE, Y.-Y.; TANG, T.-K.; LAI, O.-M. Health Benefits, Enzymatic Production, and Application of Medium- and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. R137–R144, ago. 2012.
- LEITE, L. DE S.; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil. **Journal of Water Process Engineering**, v. 31, p. 100821, out. 2019.
- LERIN, L. A. et al. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2381–2394, 7 dez. 2014.
- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, abr. 2010.
- LI, H. et al. Assessment of the impact of post-injection on exhaust pollutants emitted from a diesel engine fueled with biodiesel. **Renewable Energy**, v. 114, p. 924–933, dez. 2017.
- LI, H. et al. Environment-enhancing process for algal wastewater treatment, heavy metal control and hydrothermal biofuel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 122421, fev. 2020a.
- LI, P.; SAKURAGI, K.; MAKINO, H. Extraction techniques in sustainable biofuel production: A concise review. **Fuel Processing Technology**, v. 193, p. 295–303, out. 2019.
- LI, S. et al. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant thermostable alkylsulfatase (SdsAP) from *Pseudomonas* sp. S9. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2084–2089, dez. 2016.

- LI, S. et al. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 131, p. 110005, out. 2020b.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 764–771, 1 nov. 2007.
- LIM, S.; TEONG, L. K. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 938–954, abr. 2010.
- LIMA, G. V. et al. Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 546, p. 7–14, set. 2017.
- LIMA, P. J. M. et al. An overview on the conversion of glycerol to value-added industrial products via chemical and biochemical routes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.2098, 5 mar. 2021.
- LIU, C.-Z. et al. Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. **Applied Energy**, v. 92, p. 406–414, abr. 2012.
- LIU, D. et al. Structure and properties of sulfonated poly(arylene ether)s with densely sulfonated segments containing mono-, di- and tri-tetraphenylmethane as proton exchange membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 620, p. 118856, fev. 2021.
- LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzyme immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, maio 2018.
- LIU, J. et al. Rapid transesterification of micro-amount of lipids from microalgae via a micro-mixer reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 229, 30 dez. 2015.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 267–298.
- LOZANO, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. **Green Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 555, 2010.
- LOZANO, P. et al. Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. **Green Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1406, 2011.
- LOZANO, P. et al. Green biocatalytic synthesis of biodiesel from microalgae in one-pot systems based on sponge-like ionic liquids. **Catalysis Today**, v. 346, p. 87–92, abr. 2020.
- LOZANO, P.; BERNAL, J. M.; VAULTIER, M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3461–3467, nov. 2011.

LUTHIERRE GAMA CAVALCANTE, A. et al. Preparation, Characterization, and Enantioselectivity of Polyacrylate Microcapsules Entrapping *Ananas comosus* Extract. **Revista Virtual de Química**, p. 1–11, 2021.

MA, G. et al. A Robust Two-Step Process for the Efficient Conversion of Acidic Soybean Oil for Biodiesel Production. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 527, 7 nov. 2018.

MADEIRA, M. S. et al. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. **Livestock Science**, v. 205, p. 111–121, nov. 2017.

MAHANA, A.; GULIY, O. I.; MEHTA, S. K. Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticles in freshwater microalgae: Current status and future challenges. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111662, jan. 2021.

MAITY, J. P. et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, v. 78, p. 104–113, dez. 2014.

MAKAREVICIENE, V.; SENDZIKIENE, E. Application of microalgae for the production of biodiesel fuel. In: **Handbook of Algal Science, Technology and Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 353–365.

MAKAREVICIENE, V.; SENDZIKIENE, E.; GAIDE, I. Application of heterogeneous catalysis to biodiesel synthesis using microalgae oil. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 15, n. 5, p. 97, 30 out. 2021.

MALAR, C. G.; SEENUVASAN, M.; KUMAR, K. S. Basic study on lipase-immobilized magnetic nanoparticles. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, v. 4, n. 2, p. 1–62, 5 dez. 2019.

MAMBA, G. et al. State of the art on the photocatalytic applications of graphene based nanostructures: From elimination of hazardous pollutants to disinfection and fuel generation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, p. 103505, abr. 2020.

MANI RATHNAM, V.; MADRAS, G. Conversion of *Shizochitrium limacinum* microalgae to biodiesel by non-catalytic transesterification using various supercritical fluids. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 121538, set. 2019.

MANI RATHNAM, V.; MODAK, J. M.; MADRAS, G. Non-catalytic transesterification of dry microalgae to fatty acid ethyl esters using supercritical ethanol and ethyl acetate. **Fuel**, v. 275, p. 117998, set. 2020.

MANOEL, E. A. et al. Design of a core–shell support to improve lipase features by immobilization. **RSC Advances**, v. 6, n. 67, p. 62814–62824, 2016.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, nov. 2014.

MARTÍNEZ, N. et al. Obtaining biodiesel from microalgae oil using ultrasound-assisted in-situ alkaline transesterification. **Fuel**, v. 202, p. 512–519, ago. 2017.

MARTINS, A. A. et al. Sustainability evaluation of biodiesel from arthrospira platensis and chlorella vulgaris under mixotrophic conditions and salinity stress. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 571–576, 2016.

MARTI-QUIJAL, F. J. et al. Influence of different sources of vegetable, whey and microalgae proteins on the physicochemical properties and amino acid profile of fresh pork sausages. **LWT**, v. 110, p. 316–323, ago. 2019.

MAT YUSOFF, M.; GORDON, M. H.; NIRANJAN, K. Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 60–82, jan. 2015.

MATA, T. M. et al. Sustainability and economic evaluation of microalgae grown in brewery wastewater. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 151–158, set. 2014.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, NIDIA. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

MAZANOV, S. V. et al. Continuous production of biodiesel from rapeseed oil by ultrasonic assist transesterification in supercritical ethanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 118, p. 107–118, dez. 2016.

MELO, A. et al. Synthesis of Benzyl Acetate Catalyzed by Lipase Immobilized in Nontoxic Chitosan-Polyphosphate Beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2165, 7 dez. 2017.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 5, p. 539–547, maio 2011.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841–846, abr. 2006.

MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, maio 2016.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126–135, jul. 2012.

MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 165–178, 31 jun. 2013.

MINDREBO, J. T. et al. Unveiling the functional diversity of the alpha/beta hydrolase superfamily in the plant kingdom. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 41, p. 233–246, dez. 2016.

MIRIZADEH, S.; NOSRATI, M.; SHOJAOSADATI, S. A. Synergistic Effect of Nutrient and Salt Stress on Lipid Productivity of *Chlorella vulgaris* Through Two-Stage Cultivation. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 2, p. 507–517, 6 jun. 2020.

MISRA, N. et al. Way forward to achieve sustainable and cost-effective biofuel production from microalgae: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 11, p. 2735–2756, 2 nov. 2016.

MOHAMADZADEH SHIRAZI, H.; KARIMI-SABET, J.; GHOTBI, C. Biodiesel production from *Spirulina* microalgae feedstock using direct transesterification near supercritical methanol condition. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 378–386, set. 2017.

MOHAMMADI, M. et al. A novel approach for bioconjugation of *Rhizomucor miehei* lipase (RML) onto amine-functionalized supports; Application for enantioselective resolution of rac-ibuprofen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 523–531, out. 2018.

MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy Policy**, v. 63, p. 114–122, dez. 2013.

MOLAZADEH, M. et al. The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment With CO₂ Biofixation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–4, mar. 2019.

MONDAL, M. et al. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 99, 30 jun. 2017.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of Lipase A from *Candida Antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 17 ago. 2019a.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from *Candida Antarctica* Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts' Performance under Ultrasonic Irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5807, 19 nov. 2019b.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Enzyme-Coated Micro-Crystals: An Almost Forgotten but Very Simple and Elegant Immobilization Strategy. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 891, 6 ago. 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, fev. 2021a.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141–154, fev. 2021b.

MORADI-KHEIBARI, N. et al. Recent Advances in Lipid Extraction for Biodiesel Production. In: **Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 179–198.

MORAIS JUNIOR, W. G. et al. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, v. 528, p. 735562, nov. 2020.

- MOREIRA, K. S. et al. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya* sp.) via RSM. **Catalysts**, v. 10, n. 4, p. 414, 9 abr. 2020.
- MOUAD, A. M. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 64–68, abr. 2016.
- MUTANDA, T. et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 57–70, jan. 2011.
- MWAURAH, P. W. et al. Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 3–20, 4 jan. 2020.
- NAGARAJAN, S. et al. An updated comprehensive techno-economic analysis of algae biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 150–156, out. 2013.
- NAN, Y. et al. Production of biodiesel from microalgae oil (*Chlorella protothecoides*) by non-catalytic transesterification in supercritical methanol and ethanol: Process optimization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 174–182, fev. 2015.
- NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Processing Technology**, v. 120, p. 79–88, abr. 2014.
- NAVARRO LÓPEZ, E. et al. Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* lipids through transesterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 236–244, mar. 2016.
- NAWAZ, M. A. et al. Maltase entrapment approach as an efficient alternative to increase the stability and recycling efficiency of free enzyme within agarose matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 64, p. 31–38, jul. 2016.
- NGUYEN, B. T.; RITTMANN, B. E. Predicting Dissolved Inorganic Carbon in Photoautotrophic Microalgae Culture via the Nitrogen Source. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 16, p. 9826–9831, 18 ago. 2015.
- NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 30 nov. 2017.
- NISAR, J. et al. Enhanced biodiesel production from *Jatropha* oil using calcined waste animal bones as catalyst. **Renewable Energy**, v. 101, p. 111–119, fev. 2017.
- NITSOS, C. et al. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. **Biotechnology Advances**, v. 45, p. 107650, dez. 2020.
- NORJANNAH, B. et al. Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review. **RSC Advances**, v. 6, n. 65, p. 60034–60055, 2016.
- NZAYISENGA, J. C. et al. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 4, 7 dez. 2020.

OKORO, O. V.; SUN, Z.; BIRCH, J. Lipases for Biofuel Production. In: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. (Eds.). . **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 150–157.

OKORO, V. et al. Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109364, nov. 2019.

OLÁH, J. et al. Impact of Industry 4.0 on Environmental Sustainability. **Sustainability**, v. 12, n. 11, p. 4674, 8 jun. 2020.

OLTRA, C. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. **Energy Policy**, v. 39, n. 3, p. 1774–1781, mar. 2011.

ONCEL, S.; SUKAN, F. V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4755–4760, jul. 2008.

ONG, H. C. et al. Recent advances in biodiesel production from agricultural products and microalgae using ionic liquids: Opportunities and challenges. **Energy Conversion and Management**, v. 228, p. 113647, jan. 2021.

ONG, L. K. et al. Optimization of catalyst-free production of biodiesel from *Ceiba pentandra* (kapok) oil with high free fatty acid contents. **Energy**, v. 57, p. 615–623, ago. 2013.

ORR, V. C. A. et al. Disruption and Wet Extraction of the Microalgae *Chlorella vulgaris* Using Room-Temperature Ionic Liquids. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 2, p. 591–600, 4 fev. 2016.

OZSEZEN, A. N. et al. Comparison of Performance and Combustion Parameters in a Heavy-Duty Diesel Engine Fueled with Iso-Butanol/Diesel Fuel Blends. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 29, n. 5, p. 525–541, 1 out. 2011.

PAKURÁR, M. et al. The impact of green practices, cooperation and innovation on the performance of supply chains using statistical methods of meta-analysis. **Journal of International Studies**, v. 13, n. 3, p. 111–128, set. 2020.

PALANI, Y. et al. Performance and emission characteristics of biodiesel-blend in diesel engine: A review. **Environmental Engineering Research**, v. 27, n. 1, p. 200338– 0, 28 dez. 2020.

PALUDO, N. et al. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 89–94, jan. 2015.

PANG, N. et al. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 112, p. 450–460, set. 2019a.

PANG, S. M. et al. Mechanical stability of α T-catenin and its activation by force for vinculin binding. **Molecular Biology of the Cell**, v. 30, n. 16, p. 1930–1937, 22 jul. 2019b.

- PASCOAL, A. et al. REVIEW: Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 119–126, dez. 2018.
- PASHANGEH, KH. et al. Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 300–307, dez. 2017.
- PATEL, A. et al. Extraction of lipids from algae using supercritical carbon dioxide. In: **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**. [s.l.] Elsevier, 2020a. p. 17–39.
- PATEL, A. et al. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 434, 19 mar. 2020b.
- PATRA, S.; SAMANTA, A. Microheterogeneity of Some Imidazolium Ionic Liquids As Revealed by Fluorescence Correlation Spectroscopy and Lifetime Studies. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 40, p. 12275–12283, 11 out. 2012.
- PEDRUZI, G. O. L. et al. Biomass accumulation-influencing factors in microalgae farms. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 24, n. 2, p. 134–139, fev. 2020.
- PERALTA-RUIZ, Y.; GONZÁLEZ-DELGADO, A.-D.; KAFAROV, V. Evaluation of alternatives for microalgae oil extraction based on exergy analysis. **Applied Energy**, v. 101, p. 226–236, jan. 2013.
- PIEMONTE, V. et al. Biodiesel production from microalgae: ionic liquid process simulation. **Journal of Cleaner Production**, v. 111, p. 62–68, jan. 2016.
- PILOTO-RODRÍGUEZ, R. et al. Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 833–842, mar. 2017.
- PINHO, D. et al. Evaluating the Potential of Biodiesel Production through Microalgae Farming in Photobioreactor and High Rate Ponds from Wastewater Treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2429–2437, 2017.
- PINNOLA, A.; FORMIGHIERI, C.; BASSI, R. Algae: A New Biomass Resource. In: **Encyclopedia of Sustainability Science and Technology**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 1–33.
- PINOTTI, L. M. et al. Stabilization of Glycosylated β -Glucosidase by Intramolecular Crosslinking Between Oxidized Glycosidic Chains and Lysine Residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, n. 1, p. 325–337, 7 set. 2020.
- PINTO, A. C. et al. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1313–1330, nov. 2005.
- PIRES, J. C. M. et al. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 8, p. 5096–5105, 15 ago. 2013.

POLITAYEVA, N. A. et al. Research of pH influence on sorption properties of sorbents on a basis of residual biomass of microalgae *Chlorella sorokiniana* and duckweed *Lemna minor*. **E3S Web of Conferences**, v. 124, p. 01050, 25 out. 2019.

POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511–525, set. 2015.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 6 nov. 2004.

QIAN, J.; YUN, Z.; SHI, H. Cogeneration of biodiesel and nontoxic cottonseed meal from cottonseed processed by two-phase solvent extraction. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2750–2756, dez. 2010.

QUERO-JIMÉNEZ, P. C.; ARIAS FELIPE, L. A.; LÓPEZ, L. R. Oil extraction and derivatization method: a review. **Open Access Journal of Science**, v. 4, n. 3, p. 110–1120, 7 set. 2020.

RAHEEM, A. et al. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. **Journal of Cleaner Production**, v. 181, p. 42–59, abr. 2018.

RAHMAN, M. A. et al. Biodiesel production from microalgae *Spirulina maxima* by two step process: Optimization of process variable. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 140–147, abr. 2017.

RAJA, R. et al. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 77–88, 11 jan. 2008.

RAJAK, U. et al. Performance and emission analysis of a diesel engine using hydrogen enriched n-butanol, diethyl ester and *Spirulina* microalgae biodiesel. **Fuel**, v. 271, p. 117645, jul. 2020.

RAJAK, U.; NASHINE, P.; VERMA, T. N. Assessment of diesel engine performance using spirulina microalgae biodiesel. **Energy**, v. 166, p. 1025–1036, jan. 2019a.

RAJAK, U.; NASHINE, P.; VERMA, T. N. Characteristics of microalgae spirulina biodiesel with the impact of n-butanol addition on a CI engine. **Energy**, v. 189, p. 116311, dez. 2019b.

RAJAK, U.; NASHINE, P.; VERMA, T. N. Effect of spirulina microalgae biodiesel enriched with diesel fuel on performance and emission characteristics of CI engine. **Fuel**, v. 268, p. 117305, maio 2020.

RAJAK, U.; VERMA, T. N. *Spirulina* microalgae biodiesel – A novel renewable alternative energy source for compression ignition engine. **Journal of Cleaner Production**, v. 201, p. 343–357, nov. 2018.

RAJESH KUMAR, B.; SARAVANAN, S. Effect of exhaust gas recirculation (EGR) on performance and emissions of a constant speed DI diesel engine fueled with pentanol/diesel blends. **Fuel**, v. 160, p. 217–226, nov. 2015.

RAMACHANDRAN, K. et al. Recent developments for biodiesel production by ultrasonic assist transesterification using different heterogeneous catalysts: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, p. 410–418, jun. 2013.

RAMNATH, L.; SITHOLE, B.; GOVINDEN, R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 179–192, mar. 2017.

RANJITH KUMAR, R.; HANUMANATHA RAO, P.; ARUMUGAM, M. Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 1–9, 8 jan. 2015.

RAOUFI, Z.; MOUSAVI GARGARI, S. L. Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 1–8, dez. 2018.

RASHID, N. et al. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 760–778, dez. 2014.

RASTOGI, R. P. et al. Algal Green Energy – R&D and technological perspectives for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2946–2969, fev. 2018.

RAVINDRAN, B. et al. Microalgae Potential and Multiple Roles—Current Progress and Future Prospects—An Overview. **Sustainability**, v. 8, n. 12, p. 1215, 25 nov. 2016.

RAWAT, I. et al. Improving the feasibility of producing biofuels from microalgae using wastewater. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13–14, p. 1765–1775, jul. 2013.

REHMAN, S. et al. Catalytic, Kinetic and Thermodynamic Characteristics of an Extracellular Lipase from *Penicillium notatum*. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 1, p. 281–291, 25 jan. 2017.

REIS, C. et al. Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019.

RIOS, N. S. et al. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R, S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 246–258, nov. 2016.

RIOS, N. S. et al. Comparison of the immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on divinylsulfone or p-benzoquinone activated support. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 936–945, ago. 2019.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, set. 2018.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 4, p. 1155–1166, 2 abr. 2021.

- RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, p. 144–148, nov. 2014.
- RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, set. 2019.
- RÖTTIG, A. et al. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1713–1733, 22 fev. 2010.
- RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, p. 107–118, jan. 2016a.
- RUEDA, N. et al. Reversible Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Amino Agarose Beads Prevents Enzyme Desorption. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 646, 16 maio 2016b.
- RUEDA, N. et al. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, jun. 2016c.
- RUSTEN, B.; SAHU, A. K. Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 6, p. 1195–1201, 1 set. 2011.
- SAKA, C.; KAYA, M.; BEKIROĞULLARI, M. Spirulina Platensis microalgae strain modified with phosphoric acid as a novel support material for Co–B catalysts: Its application to hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 4, p. 2872–2883, jan. 2020.
- SAKA, S.; ISAYAMA, Y. A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. **Fuel**, v. 88, n. 7, p. 1307–1313, jul. 2009.
- SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Biodiesel Production (FAEEs) by Heterogeneous Combi-Lipase Biocatalysts Using Wet Extracted Lipids from Microalgae. **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 296, 25 mar. 2019.
- SANI, Y. M.; DAUD, W. M. A. W.; ABDUL AZIZ, A. R. Solid acid-catalyzed biodiesel production from microalgal oil—The dual advantage. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 113–121, set. 2013.
- SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S. Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 6, p. 896–916, nov. 2016.
- SANTOS, J. C. S. DOS et al. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, set. 2015.
- SCHRECK, S. D.; GRUNDEN, A. M. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1011–1021, 7 fev. 2014.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199–210, maio 1998.

SCHWARZ, C. E. et al. High pressure phase equilibrium measurements of long chain alcohols in supercritical ethane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 2, p. 554–565, dez. 2010.

SEKOAI, P. T. et al. Application of nanoparticles in biofuels: An overview. **Fuel**, v. 237, p. 380–397, fev. 2019.

SEN GUPTA, S.; SHASTRI, Y.; BHARTIYA, S. Model-based optimisation of biodiesel production from microalgae. **Computers & Chemical Engineering**, v. 89, p. 222–249, jun. 2016.

SEYED HOSSEINI, N.; SHANG, H.; SCOTT, J. A. Optimization of microalgae-sourced lipids production for biodiesel in a top-lit gas-lift bioreactor using response surface methodology. **Energy**, v. 146, p. 47–56, mar. 2018.

SHAHI, T. et al. Bio-oil production from residual biomass of microalgae after lipid extraction: The case of Dunaliella Sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101494, jan. 2020.

SHANKAR, M. et al. Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water Chlorella and Chlorococcum microalgae. **Algal Research**, v. 25, p. 228–236, jul. 2017.

SHARIFI, M. et al. Immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme by covalent attachment on modified cellulose microfibrils using different chemical activation strategies: Characterization and stability studies. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 191–199, jan. 2019.

SHARMA, P. et al. Purification and characterization of lipase by Bacillus methylotrophicus PS3 under submerged fermentation and its application in the detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369–377, dez. 2017.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; KORSTAD, J. Application of an Efficient Nonconventional Heterogeneous Catalyst for Biodiesel Synthesis from Pongamia pinnata Oil. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 3223–3231, 20 maio 2010.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. **ChemSusChem**, v. 12, n. 13, p. 2859–2881, 5 jul. 2019.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 27 mar. 2013.

SHOKRAVI, Z. et al. Improving ‘Lipid Productivity’ in Microalgae by Bilateral Enhancement of Biomass and Lipid Contents: A Review. **Sustainability**, v. 12, n. 21, p. 9083, 31 out. 2020.

SILITONGA, A. S. et al. A global comparative review of biodiesel production from jatropha curcas using different homogeneous acid and alkaline catalysts: Study of physical and

chemical properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 514–533, ago. 2013.

SILVA, C. E. DE F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from Microalgal Biomass: A Promising Approach in Biorefinery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19160816, 2019.

SILVA, F. C. DA et al. Quantification and qualification of exhaust gases in agricultural diesel engine operating with biodiesel mixtures. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 10, p. 794–799, out. 2019.

SINGH, A.; PAL, A.; MAJI, S. Biodiesel production from microalgae oil through conventional and ultrasonic methods. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 39, n. 8, p. 806–810, 18 abr. 2017.

SINGH, B. et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216–245, jan. 2014.

SINGH, T. A.; JAJOO, A.; BHASIN, S. Optimization of various encapsulation systems for efficient immobilization of actinobacterial glucose isomerase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, p. 101766, out. 2020.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In: KIM, S.-K.; TOLDRÁ, F. (Eds.). . **Advances in Food and Nutrition Research**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2016. p. 179–211.

SIVAKANTHAN, S.; JAYASOORIYA, A. P.; MADHUIJITH, T. Optimization of the production of structured lipid by enzymatic interesterification from coconut (*Cocos nucifera*) oil and sesame (*Sesamum indicum*) oil using Response Surface Methodology. **LWT**, v. 101, p. 723–730, mar. 2019.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. for methyl ester production from algal oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p. 517–522, maio 2016.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Production of methyl ester from two microalgae by two-step transesterification and direct transesterification. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 5, p. 4950–4963, 19 fev. 2017a.

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

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Microalgae as feedstock for biodiesel production under ultrasound treatment – A review. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 877–887, fev. 2018.

SKJOLD-JØRGENSEN, J. et al. Altering the Activation Mechanism in *Thermomyces lanuginosus* Lipase. **Biochemistry**, v. 53, n. 25, p. 4152–4160, 16 jul. 2014.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 29–38, jun. 2013.

SMETANA, S. et al. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162–170, dez. 2017.

SOARES, A. DE S. et al. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT**, v. 130, p. 109636, ago. 2020.

SOJITRA, U. V.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 213, p. 296–305, dez. 2016.

SONG, C. et al. Integration of CO₂ absorption with biological transformation via using rich ammonia solution as a nutrient source for microalgae cultivation. **Energy**, v. 179, p. 618–627, jul. 2019a.

SONG, C. et al. Absorption-microalgae hybrid CO₂ capture and biotransformation strategy—A review. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 88, p. 109–117, set. 2019b.

SOUZA, J. E. S. et al. Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, p. 254, 15 jun. 2020.

SOUZA, L. T. DE A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. [s.l.] Editora Blucher, 2017. p. 529–568.

STOIMENOVSKI, J. et al. Protic pharmaceutical ionic liquids and solids: Aspects of protonics. **Faraday Discuss.**, v. 154, p. 335–352, 2012.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 67–75, mar. 2016.

SUESCUN, A. et al. Immobilization of lipases on glyoxyl–octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1211–1217, ago. 2015.

SUGANYA, T.; KASIRAJAN, R.; RENGANATHAN, S. Ultrasound-enhanced rapid in situ transesterification of marine macroalgae *Enteromorpha compressa* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 283–290, mar. 2014.

SUN, X.-M. et al. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 272, 4 dez. 2018a.

SUN, Y. et al. Effect of water content on [Bmim][HSO₄] assisted in-situ transesterification of wet *Nannochloropsis oceanica*. **Applied Energy**, v. 226, p. 461–468, set. 2018b.

SUPARMANIAM, U. et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109361, nov. 2019.

SURENDHIRAN, D.; SIRAJUNNISA, A. R.; VIJAY, M. An alternative method for production of microalgal biodiesel using novel *Bacillus* lipase. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 715–725, 7 out. 2015.

SURENDHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIRAJUNNISA, A. R. Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1294–1300, set. 2014.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, v. 200, p. 1–10, jul. 2017.

TAHER, H. et al. A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–25, 11 set. 2011.

TAHER, H. et al. Enzymatic biodiesel production of microalgae lipids under supercritical carbon dioxide: Process optimization and integration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 103–113, set. 2014.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S. The use of alternative solvents in enzymatic biodiesel production: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 1, p. 168–194, 27 jan. 2017.

TALEKAR, S. et al. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, v. 3, n. 31, p. 12485, 2013.

TAN, J. SEN et al. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 116–129, 1 jan. 2020.

TANG, S.; BAKER, G. A.; ZHAO, H. Ether- and alcohol-functionalized task-specific ionic liquids: attractive properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 10, p. 4030, 2012.

TANGY, A. et al. Continuous flow through a microwave oven for the large-scale production of biodiesel from waste cooking oil. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 333–341, jan. 2017.

TAVANO, O. L. et al. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, mar. 2018.

THANGARAJ, B. et al. Catalysis in biodiesel production—a review. **Clean Energy**, v. 3, n. 1, p. 2–23, 27 fev. 2019.

TIAN, X. et al. Lipase-catalyzed methanolysis of microalgae oil for biodiesel production and PUFAs concentration. **Catalysis Communications**, v. 84, p. 44–47, set. 2016.

TIAN, X. et al. A novel process of lipase-mediated biodiesel production by the introduction of dimethyl carbonate. **Catalysis Communications**, v. 101, p. 89–92, nov. 2017.

TIWARI, G. J. et al. Lipase genes expressed in rice bran: LOC_Os11g43510 encodes a novel rice lipase. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 43–52, set. 2016.

TORRES, N. H. et al. Treatment of wastewater from biodiesel generation and its toxicity evaluation by *Raphidocelis subcapitata*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 563–574, jun. 2018.

TRAN, D.-T. et al. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 119–127, mar. 2012.

TROFIMCHUK, O. A. et al. Photobioreactor Simulation for Microalgae *Chlorella* Cultivation in Process. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 739, p. 012021, 7 fev. 2020.

TÜCCAR, G.; ÖZGÜR, T.; AYDIN, K. Effect of diesel–microalgae biodiesel–butanol blends on performance and emissions of diesel engine. **Fuel**, v. 132, p. 47–52, set. 2014.

UGGETTI, E. et al. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 437–443, jan. 2014.

ULLAH, Z. et al. Synthesis, characterization and the effect of temperature on different physicochemical properties of protic ionic liquids. **RSC Advances**, v. 5, n. 87, p. 71449–71461, 2015.

ULLAH, Z. et al. A review on ionic liquids as perspective catalysts in transesterification of different feedstock oil into biodiesel. **Journal of Molecular Liquids**, v. 266, p. 673–686, set. 2018.

USHER, P. K. et al. An overview of the potential environmental impacts of large-scale microalgae cultivation. **Biofuels**, v. 5, n. 3, p. 331–349, 4 maio 2014.

UTAMA, Q. D. et al. Lipase-Catalyzed Interesterification for the Synthesis of Medium-Long-Medium (MLM) Structured Lipids. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 305–318, 2019.

VALÉRIO, R. B. R. et al. Understanding the Biocatalytic Potential of Lipase from *Rhizopus chinensis*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 4230–4260, 14 ago. 2021.

VARGAS-ESTRADA, L. et al. Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review. **Fuel**, v. 280, p. 118598, nov. 2020.

VAZ, B. DA S. et al. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, fev. 2016.

VAZ, B. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 592–598, fev. 2019.

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

VERDASCO-MARTÍN, C. M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 75–86, jul. 2016.

VERMA, R.; SRIVASTAVA, A. Carbon dioxide sequestration and its enhanced utilization by photoautotroph microalgae. **Environmental Development**, v. 27, p. 95–106, set. 2018.

VERMA, S.; KUILA, A. Involvement of green technology in microalgal biodiesel production. **Reviews on Environmental Health**, v. 35, n. 2, p. 173–188, 25 jun. 2020.

VIEIRA SALLA, A. C. et al. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133–141, jun. 2016.

VIGUERA, M. et al. The process parameters and solid conditions that affect the supercritical CO₂ extraction of the lipids produced by microalgae. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 16–22, jul. 2016.

VILLALBA, M. et al. Operational stabilities of different chemical derivatives of Novozym 435 in an alcoholysis reaction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 35–44, ago. 2016.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Lecitase ultra: A phospholipase with great potential in biocatalysis. **Molecular Catalysis**, v. 473, p. 110405, ago. 2019.

VIRMOND, E. et al. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 197–230, jun. 2013.

VOBĚRKOVÁ, S. et al. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. **Chemosphere**, v. 202, p. 694–707, jul. 2018.

VRŠANSKÁ, M. et al. Preparation and Optimisation of Cross-Linked Enzyme Aggregates Using Native Isolate White Rot Fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the Decolourisation of Synthetic Dyes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, p. 23, 23 dez. 2017.

WÁGNER, D. S. et al. Optimal influent N-to-P ratio for stable microalgal cultivation in water treatment and nutrient recovery. **Chemosphere**, v. 262, p. 127939, jan. 2021.

WAHAB, R. A. et al. On the taught new tricks of enzyme immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, p. 104613, jul. 2020.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 904–912, jul. 2012.

WANG, D. et al. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 453–461, nov. 2018.

- WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3307–3329, 15 abr. 2014.
- WANG, Z. et al. Effect of biodiesel saturation on soot formation in diesel engines. **Fuel**, v. 175, p. 240–248, jul. 2016.
- WANG, Z. et al. Study on improving the stability of adsorption-encapsulation immobilized Laccase@ZIF-67. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00553, dez. 2020.
- WANG, Z.; DAI, Z. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview. **Nanoscale**, v. 7, n. 15, p. 6420–6431, 2015.
- WEI, L.; CHEUNG, C. S.; NING, Z. Influence of waste cooking oil biodiesel on combustion, unregulated gaseous emissions and particulate emissions of a direct-injection diesel engine. **Energy**, v. 127, p. 175–185, maio 2017.
- WIBISONO, Y. et al. Microalgae in Food-Energy-Water Nexus: A Review on Progress of Forward Osmosis Applications. **Membranes**, v. 9, n. 12, p. 166, 5 dez. 2019.
- WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An Outlook on Microalgal Biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 796–799, 13 ago. 2010.
- WILTSCHI, B. et al. Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107520, maio 2020.
- WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 713–724, dez. 2010.
- WU, S. et al. Optimization of an effective method for the conversion of crude algal lipids into biodiesel. **Fuel**, v. 197, p. 467–473, jun. 2017.
- WU, W. Inorganic nanomaterials for printed electronics: a review. **Nanoscale**, v. 9, n. 22, p. 7342–7372, 2017.
- XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 29–36, 1 fev. 2008.
- XU, M.-Q. et al. Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates as Biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 460, 17 out. 2018.
- XUE, Z. et al. Development Prospect and Preparation Technology of Edible Oil From Microalgae. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, p. 1–15, 18 jun. 2020.
- YAAKOB, M. A. et al. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 393, 14 fev. 2021.
- YANG, R. et al. Improving whole-cell biocatalysis for heligid benzoylation by the addition of ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107695, set. 2020.

YASVANTHRAJAN, N. et al. Production of biodiesel from waste bio-oil through ultrasound assisted transesterification using immobilized lipase. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101199, fev. 2021.

YELLAPU, S. K. et al. Recent developments of downstream processing for microbial lipids and conversion to biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 515–528, maio 2018.

YEN, H.-W. et al. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 291–296, maio 2015a.

YEN, H.-W. et al. CO₂, NO_x and SO_x removal from flue gas via microalgae cultivation: A critical review. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 6, p. 829–839, jun. 2015b.

YOUNG, G. et al. Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. **Separation and Purification Technology**, v. 72, n. 1, p. 118–121, 30 mar. 2010.

YU, Z. et al. Simulation of cake layer topography in heterotrophic microalgae harvesting based on interface modified diffusion-limited-aggregation (IMDLA) and its implications for membrane fouling control. **Journal of Membrane Science**, v. 620, p. 118837, fev. 2021.

ZDARTA, J. et al. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 6–27, 24 fev. 2018.

ZECHNER, R. et al. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 279–291, mar. 2012.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8505–8517, mar. 2017.

ZHANG, S.; HYATT, J. R.; AKOH, C. C. Solvent-free enzymatic synthesis of 1,2-dipalmitoylgalloylglycerol: Characterization and optimization of reaction condition. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128604, maio 2021.

ZHAO, J. et al. Enhancing the thermostability of *Rhizopus oryzae* lipase by combined mutation of hot-spots and engineering a disulfide bond. **RSC Advances**, v. 8, n. 72, p. 41247–41254, 2018.

ZHENG, H. et al. An effective immobilized haloalkane dehalogenase DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* by adsorption, crosslink and PEGylation on meso-cellular foam. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 1016–1023, mar. 2019.

ZHONG, L. et al. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207–222, jun. 2020.

ZHU, C. et al. Progress on the development of floating photobioreactor for microalgae cultivation and its application potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 190, 21 dez. 2019.

ZHU, L.-D. et al. Cultivation of *Chlorella* sp. with livestock waste compost for lipid production. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 296–300, jan. 2017.

5. CONCLUSÃO

Esta revisão proporcionou que as microalgas sejam consideradas inovações tecnológicas dos biocombustíveis, por produzir excesso de lipídios, destacando-se por sua eficiência energética. Além disso, as microalgas possuem características promissoras por apresentarem alta eficiência fotossintética, rápido crescimento, alto rendimento e cultivo em áreas não suscetíveis. Sendo que, as mais variadas categorias de microalgas são aplicadas para extração do óleo para produção de lipídios, em seguida convertidos em biodiesel.

Os catalisadores enzimáticos como lipases, são utilizados para otimizar o processo reacional nas reações de transesterificação em meio aquoso ou não aquoso em diversas aplicações industriais. Desse modo, as lipases são destaque como biocatalisadores devido às suas condições específicas. O uso de lipases imobilizadas traz um diferencial para síntese do biodiesel, pois as técnicas de imobilização proporcionam o reaproveitamento e otimização da reação, aumentando a sua estabilidade com/sem uso de solventes orgânicos nas reações de transesterificação. Sendo assim, o desempenho do biocatalisador pode ocorrer de maneira seletiva sob condições amenas de temperatura, pressão, pH e em meio aquoso. Logo, o solvente ideal depende exclusivamente do método de extração dos lipídios. Em destaque, os fluidos supercríticos como CO₂ supercrítico ou co-solvente, para produção industrial em larga escala.

Em suma, a aplicação de solventes e as técnicas de imobilização promovem a utilização da biomassa de microalgas como inovação no mercado para obtenção de biocombustíveis e biodiesel. Desse modo, o investimento em fontes renováveis é promissor para o desenvolvimento do setor energético e econômico. Portanto, apesar desta pesquisa trazer diversas vantagens para uso das microalgas, se faz necessário ainda estudos e pesquisas aprimoradas para desenvolvimento em larga escala industrial. Assim, a busca por novos biocombustíveis, mostra o óleo de microalgas como uma fonte promissora de energia sustentável, despertando assim, o interesse para pesquisas futuras com a tecnologia do óleo de microalgas para produção de biodiesel.