

PROPRIEDADES FÍSICAS DO ÓLEO E DO BIODIESEL DA MICROALGA *CHLORELLA PROTOTHECOIDES*

K. W. LUCCHESI¹, F. R. M. BATISTA^{1,*} e A. J. A. MEIRELLES¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Laboratório EXTRAE
*E-mail para contato: f.fabio.batista@gmail.com

RESUMO – A busca por fontes lipídicas alternativas para a produção de biodiesel vem alavancando pesquisas em torno do óleo extraído de microalgas uma vez que estas não competem com a produção de oleaginosas para fins alimentícios. Assim, este trabalho visa investigar propriedades físicas do óleo e do biodiesel de microalgas da espécie *Chlorella protothecoides*. Amostras de óleo foram obtidas junto à Soley Biotechnology Institute (SOLEYBIO) e caracterizadas segundo o perfil de ácidos graxos, estimando-se a composição em triacilgliceróis. Biodiesel metílico e etílico do óleo de microalga foram preparados segundo metodologia adaptada pelo próprio laboratório. Análise de acidez, teor de água e densidade e viscosidade em função da temperatura (20°C a 85°C) para o óleo, e análise da estabilidade oxidativa e teor de água para o biodiesel metílico foram realizadas. Essas propriedades foram comparadas com biodieseis oriundos de oleaginosas convencionais demonstrando a grande viabilidade do biodiesel de microalga.

1. INTRODUÇÃO

Embora o uso de óleos vegetais para a produção de combustível seja considerado um processo renovável, a produção de biodiesel em grandes quantidades a partir de oleaginosas vem sendo considerada insustentável (Chisti, 2008). Isso porque o aumento da produtividade de biodiesel a partir de oleaginosas irá demandar uma elevada quantidade de terras agricultáveis, aumentando a competição com a produção de alimentos, podendo causar grandes impactos sociais. Nesse contexto surge o possível conflito “combustível versus alimento” amplamente discutido na literatura científica (Singh et al., 2011). Esse possível conflito vem impulsionando pesquisas em torno dos combustíveis de segunda (material celulósico) e terceira (algas/microalgas) gerações através da utilização de matérias-primas não alimentares. Nesse contexto, um destaque especial vem sendo dispensado aos biocombustíveis, em especial ao biodiesel, produzidos a partir de microalgas. Esses microorganismos podem se desenvolver rapidamente em água doce ou salgada sem utilizar terras agricultáveis e, portanto, não competindo com a produção de alimentos, sendo que muitas das espécies garantem elevada geração de biomassa e grande capacidade para a produção de óleo (Chen et al, 2012; Singh et al., 2011).

Estudos publicados recentemente relatam espécies de microalgas com elevados teores de óleo que podem variar de 6% a 78% do peso seco, sugerindo a viabilidade dessa matéria prima para a

produção de biodiesel em larga escala, superando algumas das oleaginosas disponíveis para tais fins (Mata et al., 2010; Demirbas and Demirbas, 2011). Da mesma forma, a produtividade de biomassa de microalga por hectare de cultivo supera em até 94% a produtividade da palma, oleaginosa com maior produtividade por hectare (Demirbas and Demirbas, 2011).

Baseado neste cenário, este trabalho tem por objetivo estudar algumas propriedades físicas do óleo de microalgas (densidade e viscosidade em função da temperatura, teor de água, acidez e estabilidade oxidativa) e do biodiesel metílico de microalga (especialmente sua estabilidade oxidativa), comparando as mesmas com óleos e biodieseis de oleaginosas convencionais.

2. METODOLOGIA

2.1. Caracterização do óleo de microalga

20L de óleo bruto de microalga da espécie *chlorella protothecoides* foi adquirida através de uma doação generosamente realizada pelo SOLEY BIOTECHNOLOGY INSTITUTE (SOLEYBIO - EUA). O óleo foi evaporado, com o objetivo de se eliminar possíveis resíduos de solvente de extração, e então caracterizado baseado em um método adaptado de Metcalfe et al. (1976) e Hartman e Lago (1973) no qual o óleo é esterificado e os ácidos graxos determinados por cromatografia gasosa (CG). A caracterização foi realizada pelo método oficial AOCS 1-62 (2004), em cromatógrafo gasoso capilar – CGC Agilent 68650 series GC System com Coluna capilar DB – 23 AGILENT (50 % cyanopropil – metilpolisiloxano), de 60 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm, 0,25 µm de filme. As análises foram realizadas nas seguintes condições: fluxo de 1 mL/min, velocidade linear de 24 cm/s, temperatura de operação de 280 °C, temperatura do injetor de 250 °C e temperatura do forno de 110 °C – 5 min, 110 °C – 215 °C (5 °C/min), 215 °C – 25 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio e o volume de injeção igual a 1 µL. Os ésteres foram identificados por comparação com os tempos de retenção do padrão injetado e a quantificação foi realizada por normalização interna. A partir dessa composição em ácidos graxos, calculou-se a provável composição em triacilgliceróis (TAG) segundo metodologia proposta por Antoniosi-Filho et al. (1995).

2.2. Produção do biodiesel

Biodiesel metílico de microalgas foi produzido por catálise básica homogênea (metóxido de sódio) em duas etapas consecutivas, com uma razão molar total metanol/óleo de aproximadamente 5/1, a temperatura de 60°C por 2 horas (1 hora cada etapa). Após a separação da glicerina e sucessivas lavagens da fase biodiesel, o mesmo é seco em estufa por 1 hora a 115°C, e então filtrado em resina Amberlite BD10 seca para completa eliminação do álcool residual, água, glicerídeos e demais impurezas. Biodiesel etílico também foi produzido por catálise básica homogênea (etóxido de sódio) em uma única etapa com uma razão molar etanol/óleo de 9/1 a temperatura de 60°C por 3 horas de reação. Ao final da reação, o procedimento é idêntico ao apresentado para o biodiesel metílico.

2.3. Análise do teor de acidez e do teor de água

O teor de acidez do óleo foi avaliado utilizando-se o titulador automático Metrohm, modelo

808. Para a determinação do teor de água do óleo e dos biodieseis foi utilizado o equipamento Karl Fischer coulométrico (Metrohm – modelo 831 KF Coulometer), de acordo com o método oficial Ca 2e-84 (AOCS, 2009).

2.5. Propriedades físicas: densidade e viscosidade

Investigou-se a dependência da densidade e da viscosidade do óleo de microalga, em função da variação da temperatura. Para a densidade utilizou-se o equipamento da marca Anton Paar, modelo DMA 4500. Esse equipamento trabalha com temperaturas na faixa de -5 a 90 °C. Foi investigada a variação da densidade em função da temperatura para o óleo de microalgas na faixa de 20°C a 85°C com uma variação de 5°C . Os resultados foram comparados com óleos vegetais tradicionais, cuja densidade em função da temperatura já foi publicada pelo grupo de pesquisa.

Para a viscosidade, utilizou-se o equipamento da marca Anton Paar, modelo Microviscosímetro AMVn. Para determinação da viscosidade em função da variação da temperatura, foi utilizado um capilar recomendado para amostras com baixa viscosidade. A temperatura máxima de funcionamento do equipamento é de 90°C , sendo utilizado o intervalo de 20°C a 85°C para o óleo de. Assim como na análise de densidade, a viscosidade em função da temperatura de óleos tradicionais foi utilizada para comparação.

2.6. Propriedades físicas: estabilidade oxidativa do óleo e do biodiesel de microalga

A estabilidade oxidativa do óleo e do biodiesel metílico de microalgas foi determinada através da técnica Rancimat. Este método expressa a estabilidade oxidativa do material testado em função do tempo (Período de indução, PI) necessário para o início da produção de ácidos orgânicos voláteis, que são subprodutos da degradação oxidativa de éster de ácido graxo, e do próprio triglicerídeo, com o calor e o oxigênio (Tubino e Aricetti, 2013). O PI trata-se de um parâmetro comparativo muito aplicado para o controle de qualidade de matérias-primas sendo muito útil para a avaliação de diferentes tipos de óleos e de biodiesel. No Brasil essa metodologia encontra-se normatizada pela resolução ANP N°14 de 11 de maio de 2012 de acordo com a norma EN 14112 (BS EN 14112:2003) que estabelece o valor mínimo de 6 horas para o período de indução de biodieseis. Foram determinados os PI do óleo de microalga e do biodiesel metílico de microalgas, comparando os resultados com biodieseis e óleos convencionais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta a composição, em ácidos graxos, do óleo de microalga, comparando-a com a composição de óleos vegetais convencionais. As amostras foram analisadas em triplicata, apresentando um desvio padrão de 0,04%. É possível observar que o óleo de microalga possui o maior teor de ácido oléico (C 18:1) quando comparado com outros óleos vegetais comuns. Quanto ao teor de ácidos graxos insaturados, o óleo de microalga apresenta diferenças significativas somente com relação ao óleo de palma. No entanto, apesar de pouco se diferir com relação ao óleo de soja e girassol, o mesmo apresenta teor de ácidos graxos insaturados ligeiramente mais elevado do que os

dois óleos vegetais anteriormente mencionados, o que pode gerar diferenças significativas em determinadas propriedades do seu biodiesel, quando comparado com biodieseis comuns.

Tabela 1 – Composição em ácidos graxos

Ácido Graxo	Óleos						<i>Mircroalga</i>
	Esteban et al. (2012)			Ramos et al. (2009)			
	<i>Soja</i>	<i>Palma</i>	<i>Girassol</i>	<i>Soja</i>	<i>Palma</i>	<i>Girassol</i>	
C 12:0	-	0,10 %	-	-	0,10 %	-	-
C 14:0	-	0,90 %	-	-	0,70 %	-	-
C 16:0	11,20 %	45,60 %	6,70 %	11,30 %	36,70 %	6,20 %	4,79 %
C 16:1	0,20 %	0,40 %	0,30 %	0,10 %	0,10 %	0,10 %	0,23 %
C 18:0	2,90 %	3,80 %	2,90 %	3,60 %	6,60 %	3,70 %	1,72 %
C 18:1	25,20 %	38,50 %	38,70 %	24,90 %	46,10 %	25,20 %	62,17 %
C 18:2	55,40 %	10,50 %	51,30 %	53,00 %	8,60 %	63,10 %	21,98 %
C 18:2 T	-	-	-	-	-	-	0,35 %
C 18:3	5,00 %	0,10 %	-	6,10 %	0,30 %	0,20 %	6,54 %
C 18:3 T	-	-	-	-	-	-	0,12 %
C 20:0	-	-	-	0,30 %	0,40 %	0,30 %	0,55 %
C 20:1	0,10 %	-	-	0,30 %	0,20 %	0,20 %	1,55 %
Outros	-	0,10 %	0,10 %	0,40 %	0,20 %	-	-
Saturados	14,10 %	50,40 %	9,60 %	15,20 %	44,50 %	10,20 %	7,10 %
Insaturados	85,90 %	49,60 %	90,30%	84,40%	55,30%	88,80%	92,94%

A partir da composição em ácidos graxos, foi estimada a composição do óleo em termos dos principais TAGs, como mostrado na Tabela 2. A diferença entre o óleo de microalga e outros óleos vegetais (representados pelo óleo de soja e palma) se torna mais evidente. Fica claro que os TAGs OOO, OOL e OOP representam mais de 55% de toda composição do óleo de microalga, de tal forma que o mesmo apresenta um peso molecular médio de 866,33 g/mol. Esse resultado já era esperado devido ao fato do ácido oléico contribuir com mais 60% de toda a composição do óleo de microalga em ácidos graxos. Comparativamente com os óleos de soja e palma, os três TAGs majoritários no óleo de microalgas representam apenas uma contribuição de 16,1% (soja) e 29,7% (palma).

Biodiesel metílico (1 L) e etílico (80 mL) do óleo de microalga foram produzidos segundo a metodologia anteriormente explicada. Devido à maior solubilidade do etanol nos ésteres etílicos, foi produzido uma menor quantidade deste biodiesel apenas com o intuito de identificar possíveis problemas apresentados na metodologia de produção e, assim, produzir um biodiesel etílico de melhor qualidade em maior escala para a continuidade dos estudos.

As análises do teor de acidez para o óleo de microalgas foram realizadas em quadruplicata, apresentando uma acidez de 0,07% com um desvio padrão de 0,003%. A baixa acidez do óleo indica uma alta viabilidade da utilização do mesmo para a produção de biodiesel, minimizando problemas relacionados à purificação do biocombustível. Comparativamente com outros óleos vegetais, o óleo de microalga é cerca de 10 a 100 vezes menos ácido do que óleos como o de soja e palma (Watanabe et al., 2002; Melero et al., 2010).

Tabela 2 – Composição em TAGs

TAG ¹	Cadeia	MM ²	Soja ³	Palma ³	Microalga
PPP	51:0	807,32	-	5,6	-
PLP	50:2	831,35	2,20	10,30	0,15
POP	50:1	833,37	1,90	31,30	0,42
PLLn	52:5	853,36	3,50	-	0,50
POLn	52:4	855,38	2,10	-	1,38
LLP	52:4	855,38	12,50	2,10	0,83
PLO	52:3	857,39	11,40	10,30	4,58
OOP	52:2	859,41	5,50	23,90	6,34
POS	52:1	861,42	1,10	5,60	0,27
LnLnL	54:8	875,37	1,30	-	0,31
LLLn	54:7	877,38	8,00	-	1,02
LnLnO	54:7	877,38	-	-	0,85
LLL	54:6	879,40	17,40	-	1,13
LnOL	54:6	879,40	4,80	-	5,64
LLO	54:5	881,41	16,40	1,00	9,38
OOLn	54:5	881,41	-	-	7,80
OOL	54:4	883,43	8,10	1,80	25,94
SLnO	54:4	883,43	-	-	0,45
SLO	54:3	885,44	-	-	1,48
OOO	54:3	885,44	2,50	4,00	23,90
POGa	54:2	887,46	-	-	0,29
OOS	54:2	887,46	1,30	2,70	2,05
GaOLn	56:5	909,47	-	-	0,35
GaOL	56:4	911,48	-	-	1,18
OOGa	56:3	913,50	-	-	1,63
OOA	56:2	915,51	-	-	0,60
Outros	-	-	-	1,40	1,53

¹ P=Palmitico, Po=Palmitoléico, O=Oléico, L=Linoléico, Ln=Linolênico, S=Esteárico, Ga=Gadoleico, A=Araquídico; ² Peso Molecular (g/mol); ³ Endo et al. (2011)

No que tange ao teor de água, o óleo de microalga apresentou um valor médio de 0,086% em massa, com um desvio padrão de 0,005%. Este valor de umidade esta abaixo dos valores encontrados para óleos vegetais comuns, tais como: óleo de palma – 0,22% (Melero et al., 2010), óleo de soja – 0,32% (Silva et al., 2010), óleo de girassol – 0,18% (Alonso et al., 2005). O baixo teor de umidade do óleo de microalga favorece a reação de transesterificação, fornecendo mais um subsidio para que o mesmo seja considerado um potencial óleo não alimentício para produção de biodiesel.

Com relação aos biodieseis, o biodiesel metílico de microalga apresentou um teor de água

médio de 300 ppm (300 mg/kg), ou seja, 0,03% de água em massa, enquanto que o biodiesel etílico apresentou um teor de água médio de 864 ppm, ou seja, 0,0864% de água em massa. Segundo a norma EN ISO 12937 e ASTM D6304, ambas adotadas no Brasil como parâmetro de controle de qualidade para o biodiesel, a concentração máxima aceitável de água no biodiesel é 500 mg/kg. Assim, apenas o biodiesel metílico apresentou-se dentro da norma. Provavelmente, devido à maior dificuldade de separação entre a água e o etanol, certa quantidade da água utilizada na lavagem do biodiesel etílico foi absorvida pelo mesmo, justificando a maior umidade encontrada. Assim, um tempo maior de secagem e a destilação do biodiesel etílico podem contribuir para a diminuição do teor de água.

3.1 Propriedades físicas: densidade e viscosidade

A densidade do óleo de microalga foi medida na faixa de temperatura de 20°C a 85°C e sua variação com a temperatura esta mostrada na Figura 1, comparativamente com as densidades do óleo de soja, palma, girassol e milho medidos por Esteban et al. (2012).

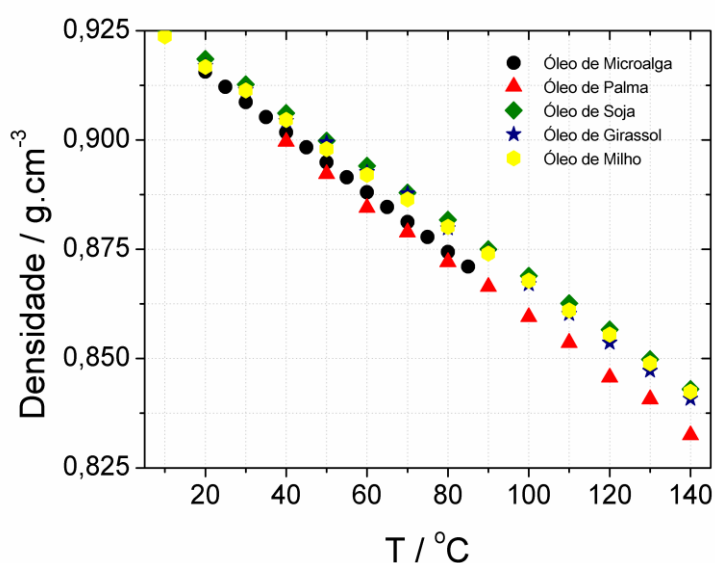


Figura 1 - Densidades do óleo de microalgas e outros óleos vegetais comuns

A análise da Figura 1 permite inferir que a densidade do óleo de microalga segue uma dependência da temperatura muito próxima dos óleos vegetais comuns, especialmente o óleo de palma, apresentando-se linearmente dependente da temperatura, decaindo com o aumento da mesma.

A Figura 2 mostra que a viscosidade do óleo de microalga pouco se difere dos óleos vegetais comuns, apresentando uma dependência da temperatura semelhante, de tal forma que a viscosidade é diminuída com o aumento da temperatura. Assim, a semelhança do comportamento

da densidade e da viscosidade do óleo de microalga com relação à temperatura, quando comprado com óleos vegetais comuns, sustenta a viabilidade o uso do mesmo para a produção de biodiesel.

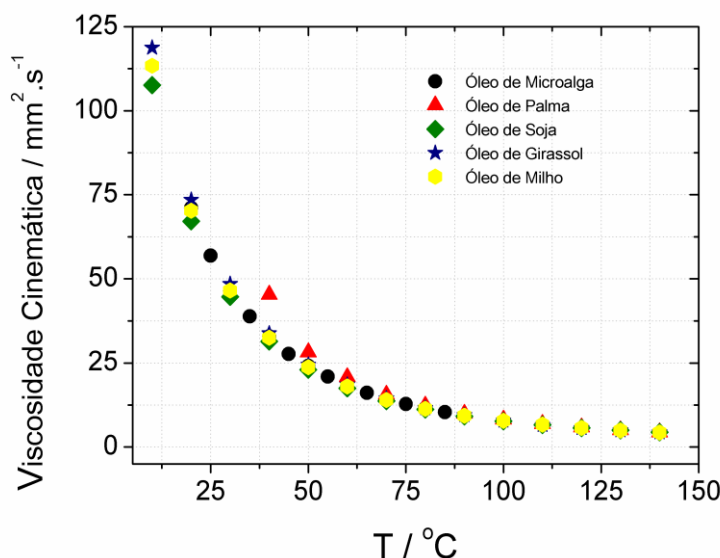


Figura 2 - Viscosidade em função da temperatura para o óleo de microalga e diferentes óleos vegetais

3.2 Propriedades físicas: estabilidade oxidativa do óleo e do biodiesel metílico

A estabilidade oxidativa do óleo e o do biodiesel metílico puros de microalga foram analisadas em triplicata apresentando um período de indução médio para o óleo de microalgas de 6,50 horas com um desvio padrão de 0,09, e um PI médio de 8,41 horas com um desvio padrão de 0,26 para o seu biodiesel metílico. Esses resultados indicam que o biodiesel metílico apresentou-se dentro das normas exigidas quanto a autooxidação uma vez que seu período de indução médio foi superior a 6 horas. A Tabela 3 apresenta uma comparação entre os PI de biodieseis produzidos a partir de óleos vegetais convencionais com relação ao biodiesel metílico de microalga, utilizando-se a metodologia rancimat sem a adição de antioxidantes.

Tabela 3 - Período de indução (PI) para diferentes biodieseis

Biodiesel	Álcool Reagente	PI (h)	Referência
Microalga	Metanol	8,41	Este trabalho
Soja	Metanol	4,38	Valle et al. (2014)
Palma	Metanol	7,20	Fattah et al. (2014)
Algodão	Metanol	3,00	Medeiros et al. (2014)
Milho	Metanol	6,50	Serqueira et al. (2014)
Soja	Etanol	5,37	Valle et al. (2014)
Algodão	Etanol	4,80	Fernandes et al. (2012)

Comparativamente com outros biodieseis metílicos, a Tabela 3 indica que o biodiesel metílico de microalga é substancialmente mais estável quanto à oxidação. Percebe-se também que o biodiesel etílico é mais estável quanto a autooxidação do que o biodiesel metílico (veja o biodiesel de soja na Tabela 3). Assim, espera-se que, para o biodiesel etílico de microralga, o período de indução seja relativamente maior do que o PI para o biodiesel metílico.

4. Conclusão

A análise das propriedades físicas do óleo e do respectivo biodiesel de microalga apresentados neste trabalho, permite concluir que o óleo de microalga apresenta-se como uma matéria prima alternativa (não alimentícia) muito eficiente para a produção de biodiesel, uma vez que suas propriedades físicas pouco se diferiram dos óleos vegetais convencionais. Assim, superados alguns problemas relacionados ao cultivo da microalga, pré-tratamento da biomassa, extração do seu óleo e purificação do biodiesel etílico produzido, as microalgas poderão ser cultivadas para a produção de óleo para fins de biocombustíveis em larga escala com elevada viabilidade.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (Processo 2012/08792-0) e à CAPES pelo apoio técnico e financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

6. Referências

- Alonso, J.F.S.J.; Sastre, J.A.L Romero-Ávila, C; Romero-Ávila, E.L.; Iglesias, C.I. Using mixtures of diesel and sunflower oil as fuel for heating purposes in Castilla y León, *Energy*, 30, 573–582, 2005.
- Antoniosi-Filho, N.R.; Mendes, O.L.; Lanças, F.M. Computer Prediction of Triacylglycerol Composition of Vegetable Oils by HRGC, *Chromatographia*. 40 (1995) 557-562.
- Chen, L., et al. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2012.02.033, 2012.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends in Biotechnology*, 26(3):126-31, 2008
- Demirbas, A.; Demirbas, M.F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*. 52:163-170, 2011.
- Endo, Y.; Ohta, A.; Kido, H.; Kuriyama, M.; Sakaguchi, Y.; Takebayashi, S.; Hirai, H.; Murakami, C.; Wada, S. Determination of Triacylglycerol Composition in Vegetable Oils Using High-performance Liquid Chromatography: A Collaborative Study, *Journal of Oleo Science*, 60(9), 451-456, 2011.
- Esteban, B.; Riba, J.R., Baquero, G.; Rius, A.; Puig, R. Temperature dependence of density and viscosity of vegetable oils. *Biomass and Bioenergy*, 42, 164-171, 2012.
- Esteban, B.; Riba, J.R., Baquero, G.; Rius, A.; Puig, R. Temperature dependence of density and viscosity of vegetable oils. *Biomass and Bioenergy*, 42, 164-171, 2012.
- Fattah, I.M.R; Masjuki, H.H.; Kalam, M.A.; Mofijur, M.; Abedin, M.J. Effect of antioxidant on the performance and emission characteristics of a diesel engine fueled with palm biodiesel blends. *Energy Conversion and Management*, 79, 265–272, 2014.
- Fernandes, D.M.; Serqueira, D.S.; Portela, F.M.; Assunção, R.M.N.; Munoz, R.A.A. Preparation and characterization of methyl and ethyl biodiesel from cottonseed oil and effect of tert-butylhydroquinone on its oxidative stability. *Fuel*, 97, 658-661, 2012.
- Hartman, L., Lago, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice*, London, v.22, p.475-476, 1973.

- Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:217–32, 2010
- Medeiros, M.L.; Cordeiro, A.M.M.T; Queiroz, N.; Soledade, L.E.B.; Souza, A.L.; Souza, A.G. Efficient Antioxidant Formulations for Use in Biodiesel. *Energy Fuels*, 28, 1074–1080, 2014.
- Melero, J.A.; Bautista, L.F.; Morales, G.; Iglesias, J.; Sánchez-Vázquez, R. Biodiesel production from crude palm oil using sulfonic acid-modified mesostructured catalysts, *Chemical Engineering Journal*, 161, 323–331, 2010
- Metcalf, J.C., Bennett, J.P., Hesketh, T.R., Houslay, M.D., Smith, G.A., Warren, G.B.: *The lateral organization of lipids around a calcium transport protein: Evidence for a phospholipid annulus that modulates function*. In: *The Structural Basis of Membrane Function*. Hatefi, Y., Djavadi-Ohanian, L. (eds.). New York: Academic Press 1976, pp. 57–67.
- Ramos, M.J.; Fernández, C.M.; Casas, A.; Rodríguez, L.; Pérez, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties, *Bioresource Technology*, 100 261–268, 2009
- Serqueira, D.S.; Fernandes, D.M.; Cunha, R.R.; Squizzato, A.L.; Santos, D.Q.; Richter, E.M.; Munoz, R.A.A. Influence of blending soybean, sunflower, colza, corn, cottonseed, and residual cooking oil methyl biodiesels on the oxidation stability. *Fuel*, 118, 16–20, 2014.
- Silva, C.C.C.M., Ribeiro, N.F.P., Souza, M.M.V.M; Aranda, D.A.G. Biodiesel production from soybean oil and methanol using hydrotalcites as catalyst, *Fuel Processing Technology*, 91, 205–210, 2010.
- Singh A, Nigam PS, Murphy JD. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresour Technol* 102:26–34, 2011.
- Tubino, M; Aricetti, J.A. A green potentiometric method for the determination of the iodine number of biodiesel, *Fuel*, 103, 1158–1163, 2013.
- Valle, M.L.M; Leonardo, R.S.; Dweck, J. Comparative study of biodiesel oxidation stability using Rancimat, PetroOXY, and low P-DSC. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 116, 113 – 118, 2014.
- Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 151–155, 2002.