



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE MONOÉSTERES A PARTIR DE BIOMASSA DE  
MICROALGA *Chlorella sp* NA PRESENÇA DE CATALISADOR  
HETEROGÊNEO A BASE DE ALUMINA SUPOSTADO COM CÁLCIO**

**NEURENE DA CRUZ**

**São Luís**  
**2016**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Cruz, Neurene da.

Estudo da Obtenção de Monoésteres a partir de Biomassa de Microalga *Chlorella* sp na presença de catalisadores heterogêneos a base de alumina suportado com cálcio / Neurene da Cruz. - 2016.

74f.

Coorientador(a): Fernando Carvalho Silva.

Orientador(a): Adeilton Pereira Maciel.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2016.

1. Biocombustíveis. 2. Catálise heterogênea. 3. *Chlorella* sp. I. Carvalho Silva, Fernando. II. Pereira Maciel, Adeilton. III. Título.

**NEURENE DA CRUZ**

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE MONOÉSTERES A PARTIR DE BIOMASSA DE  
MICROALGA *Chlorella sp* NA PRESENÇA DE CATALISADOR  
HETEROGÊNEO A BASE DE ALUMINA SUPORTADO COM CÁLCIO.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQUIM) da Universidade Federal do Maranhão, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel  
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carvalho Silva

**São Luís  
2016**

**NEURENE DA CRUZ**

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE MONOÉSTERES A PARTIR DE BIOMASSA DE  
MICROALGA *Chlorella sp* NA PRESENÇA DE CATALISADORES  
HETEROGÊNEOS A BASE DE ALUMINA SUPOSTADO COM CÁLCIO.**

Aprovada em: / /

Banca examinadora

---

Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel (Orientador)  
Doutor em Físico-Química  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

Prof. Dr. José Hilton Gomes Rangel  
Doutor em Química  
Instituto Federal de Educação do Maranhão - IFMA

---

Prof. Dr. Flávio Santos Damos  
Doutor em Química  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico este trabalho ao meu esposo Adão Passos e minhas queridas filhas, Amanda, Fernanda e Anna Beatriz pelo carinho, apoio e otimismo prestado durante toda esta etapa.

As minhas mães, Beatriz e Mudéstia, ao meu pai Antônio José (em memória), a minha tia Anaíde, a minha avó Maria do Rosário (em memória) e ao meu tio Raimundo Saraiva, estes que sempre me inspiraram a nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus irmãos Joelma, Jucélia e Raimundo.

A minha sogra Francisca Passos e ao meu sogro Raimundo Passos, que me incentivaram e deram suporte durante o decorrer deste estudo.

Aos meus primos, primas e sobrinhos que sempre me incentivaram e apoiaram como puderam.

Aos meus cunhados, cunhadas e amigos que puderam acompanhar essa minha trajetória me dando apoio para não desistir.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos, pela oportunidade de aprendizado e pela sabedoria que me foi concedida para realização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel pela orientação e discussão neste trabalho.

Ao prof. Dr. Ulisses Magalhães Nascimento, pela orientação no planejamento fatorial.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Cáritas de Jesus Silva Mendonça, Dr. Fernando Carvalho Silva, Dr. Francisco Sávio Mendes Dr<sup>a</sup>. Gilza Maria Piedade Prazeres e ao prof. Dr. Márcio Aurélio Almeida Pinheiro, por todo o apoio prestado direta e indiretamente.

Ao prof. Dr. Alan Silva de Menezes, da Central Analítica de Materiais – UFMA, pelas análises de DRX.

Ao prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pelo apoio na coleta de dados realizada no laboratório de LPQCA, assim como ao amigo Rayone que acompanhou e ajudou nas análises realizadas nesse laboratório.

Aos amigos e colegas de trabalho, Ana Flavia, Adriana, Angela, Aline, Alicia, Aline, Danielle, Deusilene, Fernanda, Jefferson, Jhonatan, Jonny, Marcelo Vinicius, Mitchell, Neto, Raquel, Rógenes, Rilza, Sergiane, Sandro, Thaynara, Thamara, Tonny, Welma Beatriz, Wendel, Ziel, pela amizade e apoio na realização desse trabalho.

Ao Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental da UFMA – NCCA/UFMA pelo espaço e estrutura física e material disponibilizados para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMA – PPGQUI/UFMA, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela qualificação profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa a FAPEMA e CNPQ pelo financiamento dos projetos do laboratório do Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental.

À fazenda Tamanduá pela doação da biomassa de *Chlorella* e a ALUMAR pela doação da alumina.

“A ciência, como um todo, não  
é nada mais do que um  
refinamento do pensar diário”.

Albert Einstein.

## RESUMO

Neste estudo, foi sintetizado um catalisador à base de alumina e cálcio e utilizado na reação de transesterificação de extratos lipídicos e na biomassa de *Chlorella sp in situ*. O catalisador foi caracterizado por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise de Energia Dispersiva (EDS) e Espectrofotometria de Fluorescência de Raios X. Nas extrações lipídicas de *Chlorella sp* utilizou-se os solventes: metanol, hexano e a mistura de metanol e hexano na proporção 2:1. Os métodos de extração foram através de Soxhlet, agitação magnética, agitação em ultrassom e agitação com aquecimento em reator Parr. As reações de transesterificação foram feitas em um reator Parr, sendo que nas reações com o extrato lipídico partiu-se de 11 g de extrato, 4% de catalisador em relação a massa do extrato, a razão álcool/extrato 15:1 volume/massa a temperatura de 150°C durante 180 minutos. As reações da biomassa *in situ* foram feitas e avaliadas por um planejamento fatorial  $2^4$  com pontos centrais, as variáveis foram o tempo de 40-180 minutos, concentração de catalisador de 4-10 %, razão álcool: biomassa 3:1- 6:1 e temperatura entre 60–150 °C. A resposta foi o teor de ésteres. As melhores condições foram: 150°C, 180 minutos, razão metanol: biomassa 3:1 v/m e concentração do catalisador 4 %. Os fatores que tiveram influência significativa na conversão dos ésteres foram a razão e quantidade de catalisador.

**Palavras-chaves:** Catálise heterogênea, Bicompostíveis, *Chlorella sp*.



## ABSTRACT

In this study, a catalyst based on alumina and calcium to transesterification reaction of lipid extracts of *Chlorella sp* biomass in situ was synthesized. The catalyst was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy Analysis (EDX) and, X-ray Fluorescence Spectroscopy (XRF). The in situ lipid extraction of *Chlorella sp* was carried on with the following solvents: methanol, hexane mixture of methanol and hexane in the ratio 2: 1. The extraction methods were performed in Soxhlet, magnetic stirring, stirring in ultrasound and stirring with heating in Parr reactor. The transesterification reactions were performed in a Parr reactor, the reactions with lipid extract came from 11g extract, 4% of catalyst in relation to the mass of the extract, ratio alcohol / extract 15: 1 volume / mass at 150 °C temperature for 180 minutes. The reactions of biomass in situ were made and evaluated by a 24 factorial design with central points, the variables were the time of 40-180 minutes 4-10% catalyst concentration, molar ratio alcohol: biomass 3: 1- 6: 1 and temperature between 60-150 °C. The result was the ester content. The best conditions were: 150 °C 180 minutes reason methanol: biomass 3: 1 v / m and catalyst concentration 4%. The factors that have significant influence on the conversion of esters were molar ratio and amount of catalyst.

**Keywords:** Heterogeneous catalysis, Biofuel, *Chlorella sp*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> (A) Biomassa seca de <i>Chlorella sp</i> , triturada e peneirada (B) produto comercial de <i>Chlorella sp</i> em cápsulas .....	18
<b>Figura 2-</b> Cultivo de microalgas em sistema aberto.....	19
<b>Figura 3-</b> Cultivos de Microalgas em Sistemas Fechados ( Fotobirreatores ) .....	20
<b>Figura 4-</b> Esquema geral da reação de transesterificação de um triglicerídeo com metanol .....	25
<b>Figura 5-</b> Esquema geral do processo de uma reação com um catalisador suportado .....	28
<b>Figura 6-</b> Fluxograma do processo de obtenção do precursor polimérico de Ca .	35
<b>Figura 7-</b> Fluxograma do processo de obtenção do catalisador de alumina/ cálcio .....	36
<b>Figura 8 -</b> Fluxograma da extração de lipídios da biomassa de <i>Chlorella sp</i> através de rota com aquecimento .....	39
<b>Figura 9-</b> Fluxograma da extração de lipídios da biomassa de <i>Chlorella sp</i> através de rota sem aquecimento .....	40
<b>Figura 10-</b> Fluxograma da reação de transesterificação do extrato lipídico .....	42
<b>Figura 11-</b> Fluxograma da reação de transesterificação da biomassa de <i>Chlorella sp in situ</i> .....	42
<b>Figura 12-</b> Colunas cromatográficas no processo de purificação dos ésteres .....	43
<b>Figura 13-</b> Espectro de FTIR a) alumina, b) alumina modificada com cálcio.....	47
<b>Figura 14-</b> Difratoograma de Raio X do Catalisador $Al_2O_3/CaO$ (b) e da alumina ( $Al_2O_3$ ) (a) .....	49
<b>Figura 15-</b> a) Micrografia alumina ( $Al_2O_3$ ) e b) Micrografia da Alumina modificada (Al - Ca) .....	50
<b>Figura 16-</b> Análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) na amostra de alumina ( $Al_2O_3$ ) .....	50
<b>Figura 17-</b> Análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) na amostra de alumina modificada ( $Al_2O_3 / Ca$ ) .....	51
<b>Figura 18-</b> Gráfico de Pareto das variáveis da reação de transesterificação in situ para otimização da síntese de ésteres. ....	57
<b>Figura 19-</b> gráfico da superfície de resposta e curva de contorno do biodiesel metílico de <i>Chlorella sp in situ</i> para a quantidade de catalisador e a razão metanol: biomassa. ....	58
<b>Figura 20-</b> Cromatograma do produto formado no ensaio catalítico com extratos lipídicos de <i>Chlorella sp</i> .....	59
<b>Figura 21-</b> <b>A</b> Cromatograma e <b>B</b> placa cromatográfica do produto formado no ensaio catalítico 16 do planejamento fatorial para síntese de ésteres metílicos ...	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química das microalgas.....	21
Tabela 2- Teor de lipídios de diferentes espécies de microalgas.....	21
Tabela 3- Relação do perfil graxo das microalgas com os diferentes tipos de cultivos .....	22
Tabela 4- Rendimento anual de óleo de oleaginosas e microalgas por área.....	26
Tabela 5- Condições Cromatográficas (CG – EM) .....	44
Tabela 6- Programa de temperatura do forno cromatográfico.....	44
Tabela 7- Planejamento fatorial $2^4$ para o biodiesel de <i>Chlorella sp in situ</i> .....	46
Tabela 8- Rendimento de lipídios extraídos em diferentes métodos utilizando os solventes, metanol, hexano e suas misturas.....	53
Tabela 9- Ensaio catalítico da reação do óleo da biomassa de <i>Chlorella in situ</i> para produção de ésteres .....	55
Tabela 10- Anova e resultados da regressão de análise fatorial completo para produção de ésteres da biomassa de <i>Chlorella sp in situ</i> .....	56
Tabela 11- Ésteres majoritários identificados nas análises da reação de transesterificação do extrato lipídico de <i>Chlorella sp</i> .....	59
Tabela 12- Ésteres majoritários identificados nas análises da reação de transesterificação da biomassa de <i>Chlorella sp in situ</i> .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**ANP** - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

**MEV** - Microscopia eletrônica de varredura

**DRX** - Difração de raios X

**EDS** - Energia dispersiva de raios X

**FTIR** - Infravermelho com transformada de Fourier

**CG/MS** - Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

**CG/DIC** - Cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chamas

**XRF** - Fluorescência de raios X

**TLC** - Cromatografia de camada fina

**IA** - Índice de acidez

$\theta$  - Teta

**t** - Tempo

**T** - Temperatura

**R** - Razão metanol/ biomassa

**C** - Concentração de catalisador

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Microalgas</b>	<b>17</b>
2.1.1 <i>Chlorellasp.</i>	17
2.1.2 Cultivo e composição química das microalgas	18
2.1.3 Separação da biomassa de algas do meio de cultura	23
<b>2.2 Biodiesel de microalgas</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Catálise</b>	<b>27</b>
2.3.1 Preparação de Catalisadores Sólidos	28
2.3.2 Óxido de Cálcio	29
2.3.3 Alumina	30
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>32</b>
<b>4. EXPERIMENTAL</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Reagentes utilizados</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Aquisição da Matéria-prima</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Equipamentos utilizados</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Síntese do Catalisador</b>	<b>34</b>
4.4.1 Obtenção de precursor polimérico	34
4.4.2 Modificação superficial da alumina com os metais	35
<b>4.5 Caracterização do catalisador</b>	<b>36</b>
4.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho	36
4.5.2 Difração de Raios X	37
4.5.3 Microscopia Eletrônica por Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva	37
4.5.4 Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda	37
<b>4.6 Extração de lipídios</b>	<b>38</b>
4.6.1 Extração de lipídios de <i>Chlorellasp</i> com aquecimento	38
4.6.2 Extração sem aquecimento	39
4.6.3 Índice de Acidez (IA) da fração lipídica	41
<b>4.7 Reação de transesterificação</b>	<b>41</b>
4.7.2 Análise Cromatográfica dos ésteres	43

<b>4.8</b>	<b>Análise de proteínas da biomassa residual proveniente da extração de lipídios</b>	<b>45</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise Estatística</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>5.1.</b>	<b>Caracterização do Catalisador</b>	<b>47</b>
5.1.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	47
5.1.2	Difração de Raios-X (DRX)	48
<b>5.1.3</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b>	<b>49</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Fluorescência de raios X por Dispersão de Comprimento de Onda</b>	<b>52</b>
<b>5.2.</b>	<b>Caracterização da biomassa</b>	<b>52</b>
5.2.1	Análise de lipídios da biomassa secada <i>Chlorella</i> sp.	52
5.2.2	Índice de acidez da fração lipídica	53
<b>5.3</b>	<b>Análise Estatística</b>	<b>54</b>
5.3.1	ANOVA	55
5.3.2	Análise do teor de éster pela superfície de resposta	57
<b>5.4</b>	<b>Caracterização dos ácidos graxos</b>	<b>58</b>
5.4.1	Análise cromatográfica	58
5.5	Análise de proteínas na biomassa residual de <i>Chlorella</i> sp.	61
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

Os impactos ambientais gerados pelo uso de combustíveis fósseis e a escassez das fontes de energia não renováveis são fatores que motivaram o desenvolvimento de tecnologias para utilização de fontes de energia renováveis. Estimativas indicam que 80% do total da energia consumida pela humanidade provêm dos combustíveis fósseis. Porém, a cada dia aumenta o interesse mundial na utilização de biocombustíveis (WESTBROOK, 2013). Segundo Lima (2005), a utilização dos derivados dos combustíveis fósseis libera na atmosfera fuligem e gases tóxicos como monóxido de carbono, óxido de enxofre e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Nesse contexto, o biodiesel é uma opção viável para substituição dos combustíveis fósseis como o diesel.

Biodiesel é um combustível renovável que contribui para redução das emissões de gases prejudiciais ao ambiente (DEMIRBAS, 2007) que consiste em uma mistura de alquil ésteres derivados de ácidos carboxílicos de cadeias longas e é obtido a partir a esterificação ou transesterificação de ácidos graxos de óleos ou gorduras de origem vegetal ou animal (ANP, 2014).

Dentre as matérias primas para produção de biodiesel, as microalgas podem ser consideradas uma fonte promissora, pois apresentam alto teor de lipídios além de outras vantagens que contribuem para a redução de impactos ambientais, como alta eficiência fotossintética, alta taxa de crescimento e cultivo sem provocar desmatamento e/ou desgaste do solo (CHISTI, 2007).

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes cultivadas em águas doce, salgada e ou residual, em tanques abertos ou em sistemas fechado com iluminação. São utilizadas para extrair substâncias que agregam alto valor comercial a fármacos e suplementos alimentares. Elas apresentam grande potencial para uso em biorremediação e biofertilização, assim como para a produção de vários tipos de biocombustíveis dos quais se cita: biohidrogênio, metano, bio-óleo, bioetanol e biodiesel (CHISTI, 2008).

*Chlorella sp* é uma das espécies de microalgas mais cultivada (SPOLAORE, 2006). A Biomassa seca de *Chlorella sp* pode apresentar 10 a 48 % de teor de lipídios. (UMDU, TUNCER E SKER 2009).

Geralmente na produção de biodiesel são utilizados os catalisadores homogêneos básicos NaOH ou KOH, que possuem atividade catalítica elevada. Contudo, de acordo com Manuale et al. (2014) e Stojković et al. (2014), os catalisadores homogêneos geram muitos efluentes industriais devido a necessidade de purificação para eliminar resíduos do meio reacional, como: sabão formado na reação, restos de álcool, óleo e catalisadores.

A possibilidade de reutilização do catalisador, a facilidade de purificação do produto e a obtenção de glicerina menos contaminada, são algumas vantagens associadas ao uso da catálise heterogênea na produção de biodiesel. Além disso, o processo gera menor quantidade de efluentes industriais. (CALERO et al., 2014; GALADIMA e MURAZA, 2014; WANG, R., SUN, L., et al., 2014; WANG, R., WU, Y., et al., 2014; GALADIMA e MURAZA, 2014). Entretanto as reações utilizando catalisadores heterogêneos requerem temperaturas mais elevadas.

Na literatura são apresentados vários trabalhos que demonstram a atividade catalítica do CaO para reação de transesterificação (ESIPOVICH et al., 2014; REYERO, ARZAMENDI e GANDÍA, 2014; TAUFIQ-YAP et al., 2014; LEE, JUAN e TAUFIQ-YAP, 2015; MIRGHIASI et al., 2014). O óxido de cálcio puro é higroscópico (MIRGHIASI et al. 2014). Essa propriedade pode comprometer a atividade catalítica, além dificultar o seu manuseio e armazenamento, portanto a utilização do óxido de cálcio associado com outras substâncias pode resolver essa problemática.

A alumina também tem sido muito utilizada como catalisador e como suporte catalítico, em função de suas diferentes estruturas cristalinas. (CASTEL, 1990; CASTRO et al., 2003).

Nesse trabalho extratos lipídicos da biomassa de microalga *Chlorella sp* e também a biomassa *in situ* foram transesterificados utilizando um catalisador heterogêneo à base de alumina e óxido de cálcio. Também foram verificadas as melhores condições reacionais de conversão dos triglicerídeos em ésteres. A extração de lipídios foi realizada utilizando os solventes metanol e hexano e suas misturas.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 2.1 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese. São microscópicas, coloniais ou filamentosas, coloridas, fotoautotróficas, procarióticas e eucarióticas. (OLAIZOLA, 2003). Podem ser encontradas em todos os ecossistemas da terra, constituindo uma grande variedade de espécies. De acordo com Richmond (2004), estima-se que existam mais de 50.000 espécies de microalgas. Destas, aproximadamente 30.000, encontradas no mar e em água doce, já foram estudadas e analisadas (CHISTI, 2007). Segundo Arregondo-Vega (1995), as microalgas são produtoras primárias de alimentos e são consideradas a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos.

As microalgas são classificadas em vários grupos como: algas verdes (Chlorophyceae), algas verde-amarelas (Xanthophyceae), algas vermelhas (Rhodophyceae), algas marrons (Phaeophyceae), cianobactérias (Cyanophyceae), dinoflagelatos (Dinophyceae) e fito-plâncton (Prasinophyceae e Eustigmatophyceae) (VAN DEN HOEK et al., 1995).

A biomassa de microalga e seus extratos têm sido transformados em produtos de alto valor agregado no mercado mundial tais como: proteínas, lipídios, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas (RICHMOND, 2004).

#### 2.1.1 *Chlorella sp*

A *Chlorella sp* é uma espécie de microalga que apresenta estrutura unicelular, esférica, globular ou elipsoidal cujo tamanho pode estar entre 2,0 µm e 10,0 µm. É aflagelada portanto não se move. Algumas espécies de *Chlorella* são de água doce outras são marinhas. Uma das características dessa microalga é a

capacidade de se adaptar às condições de cultivo, podendo crescer de forma, autotrófica, heterotrófica e mixotrófica (SPOLAORE, 2006; XU, MIAO, WU, 2006).

De acordo com Phukan et al. (2011), a composição bioquímica média da *Chlorella sp* é aproximadamente 20% de lipídios, 45% de proteínas, 20 % de carboidratos e 10% de minerais e vitaminas. Segundo com Rasoul–Amini et al. (2011), a *Chlorella sp* é comercializada principalmente como suplemento alimentar devido ao seu elevado teor protéico. A Figura 1 mostra o aspecto da biomassa seca de *Chlorella sp* (1A) e do produto comercial de *Chlorella sp* em cápsulas (1B).

**Figura 1-** (A) Biomassa seca de *Chlorella sp*, triturada e peneirada (B) produto comercial de *Chlorella sp* em cápsulas



Fonte:(A)Autora, (B) Centro de Terapias Complementares (2016)

### 2.1.2 Cultivo e composição química das microalgas

Segundo Raven (1988), um bom cultivo de microalgas depende da interação entre os fatores, físicos, químicos e biológicos. Pode-se destacar como fatores biológicos aqueles relativos ao metabolismo da espécie cultivada, como também a influência de outros organismos no desenvolvimento das microalgas (DERNER,2006). Fatores físicos e químicos como, temperatura, luz, salinidade, mobilidade dos cultivos, pH, oxigênio dissolvido, compostos tóxicos e a disponibilidade de nutrientes influenciam na cultura de microalgas (HELLENBUST, 1970; EPPLEY, 1977; YONGMANITCHAI; WARD, 1991; ANDERSEN, 2005; KUMAR et al., 2010).

De acordo com a origem da energia utilizada e com as vias metabólicas percorridas, os sistemas de produção de microalgas podem ser classificados em

autotrófico (utilização de luz), heterótrofo (utilização de substrato orgânico como a glicose) e mixotrófico (utilização das duas fontes) (HUANG, 2010; MIAO et. al., 2006).

No que se refere às tecnologias para cultura de microalgas, os sistemas são diversificados e podem ser classificados em dois tipos principais: sistemas abertos (tanques aerados com extremidades elípticas) e sistemas fechados (tubular, reator em placa, cônico, piramidal, fermentador) (DASGUPTA, et al., 2010).

Segundo Borowitzka (1999), a maioria das culturas de microalgas é realizada em tanques abertos com pouco controle dos parâmetros ambientais. Entretanto, existem cultivos feitos em equipamentos específicos chamados fotobiorreatores (sistemas fechados), nos quais é possível controlar os parâmetros ambientais e obter maior produtividade (TREDICI, 2004). A Figura 2 mostra um sistema de cultivo aberto e a Figura 3, um sistema fechado (fotobiorreatores) para cultivo de microalgas.

**Figura 2** - Cultivo de microalgas em sistema aberto.



**Fonte:** Natural Market comércio de produtos orgânicos Ltda., 2016.

**Figura 3** - Cultivos de microalgas em sistemas fechados (fotobirreatores).



Fonte: Pascalgoetgheluckphotographe, 2016.

As principais microalgas que vem sendo cultivadas comercialmente, são: *Chlorella*, *Arthorospira*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* (BECKER 2004). O cultivo comercial das microalgas atualmente é concentrado em empresas de grande porte (DERNER et al., 2006) sediadas principalmente na China, Japão, Taiwan, Estados Unidos e Índia e com uma produção anual estimada em 38 milhões de litros de biomassa de algas (FRANCO et al., 2013). Segundo Derner (2006), o cultivo de microalgas é destinado à produção de biomassa e bioprodutos. No Brasil, a produção comercial de microalgas iniciou com o objetivo de utilizar a biomassa como alimentação em sistemas de cultura de animais.

Os principais componentes químicos que constituem as microalgas são proteínas, carboidratos lipídios e ácidos nucleicos. Essa composição pode variar entre diferentes espécies. A Tabela 1 demonstra a variação na composição de alguns compostos químicos em microalgas.

**Tabela 1-** Composição química de algumas microalgas

<b>Microalgas</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lipídios</b>
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Spirogyra sp</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina maxima</i>	60- 61	13-16	6-7

Fonte: Becker, 1994.

Em geral as microalgas apresentam um potencial na produção de uma variedade de produtos, dentre os quais se pode citar: suplementos alimentares, compostos de alto valor, biorremediação, biofertilização e biocombustíveis (CHIST, 2007 e FRANCO et al., 2013).

Segundo Hu et al., (2008), algumas espécies e ou linhagens de microalgas possuem um potencial para produção de grandes quantidades de óleo. Em algumas espécies, o teor de lipídios é superior a 70% da massa total seca microalga. Essa característica é vantajosa para a produção de biodiesel. A Tabela 2 demonstra o teor de óleo de algumas espécies de microalgas (CRHISTI, 2007).

**Tabela 2-** Teor de lipídios de diferentes espécies de microalgas.

<b>Microalga</b>	<b>Teor de óleo (% de massa seca)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp</i>	28-32
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Nannochloropsis sp</i>	31-68
<i>Nechlorisoleoabudans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylumtricornutum</i>	20-30
<i>Shizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmisueccica</i>	15-23

Fonte: Chisti, 2007.

Segundo Certik e Simizu (1999), o cultivo de microalga para produção de óleo requer tanto a seleção das espécies como também um controle nas condições ambientais do meio de cultura. De acordo com Behrens e Kyle (1996), cada espécie de microalgas tem a capacidade de alterar seu metabolismo conforme a composição química do local de cultivo e a partir desse meio de cultura podem produzir teores diferentes de proteínas, lipídios e carboidratos.

A composição química dos lipídios das microalgas contém tanto ácido graxo poliinsaturados de cadeia longa, tais como ácido araquidônico (C20:4); ácido ecosapentaenóico (C20:5); ácido docosa-hexanóico(C22:6), quanto os ácidos graxos de 16 e 18 carbonos com cadeias saturadas ou com diferentes padrões de monoinsaturação como, ácido palmítico (C16:0); ácido pamitoleico (C16:1); ácido oleico (C18:1) (COBELAS e LECHADO, 1989; BASOVA, 2005; OHLROGGE, 1995; BOROWITZKA et al., 1998).Os lipídios de microalgas podem ainda apresentar modificação nos teores de ácidos graxos, conforme as condições de crescimento fototróficas (intensidade de luz e temperatura) e/ou heterotróficas (adicionando ou retirando determinadas substâncias químicas que influenciam no metabolismo das microalgas) (COBELAS e LECHADO, 1989; XU et al., 2006).

O conteúdo lipídico de uma microalga pode ser alterado pelas condições de cultivo (Tabela 3). Segundo Behrens e Kyle (1996)a presença de íon manganês (Mn<sup>+</sup>) e baixa concentração de fósforo (P) e de nitrogênio (N) provocam o aumento do teor de lipídios em microalgas.

**Tabela 3-** Relação do perfil graxo das microalgas com os diferentes tipos de cultivos.

<b>Relação do perfil graxo das microalgas</b>	<b>Tipos de cultivos</b>
Aumento no conteúdo lipídico Aumento no nº de ácidos graxos insaturados	Concentração de P baixa Concentração de CO <sub>2</sub> alta
Aumenta o conteúdo de lipídico Aumento no nº de ácidos graxos insaturados	Presença de Mn <sup>+</sup> Temperatura baixa
Aumento no nº de ácidos graxos Diminui o teor de C <sub>22</sub> Aumento o conteúdo lipídico	Aumento da intensidade luminosa Concentração de N alta Concentração de N baixa

Fonte:BehrenseKyle, 1996

### 2.1.3 Separação da biomassa de algas do meio de cultura

Antes da extração do óleo ou de qualquer outra substância de interesse da biomassa de algas, alguns procedimentos devem ser adotados. Primeiramente é necessário separar a biomassa do meio de cultivo. O processo de separação geralmente envolve a filtração, a sedimentação, a centrifugação e a floculação (DERNER et al., 2006; LEE; LEWIS; ASHMAN, 2009; VANDAMME, D., PONTES, S. C. V., GOIRIS, K., FOUBERT, I., PINOY, L. J. J., & MUYLAERT, K., 2011). A escolha do método de separação deve ter como base, as características da microalga, e o tipo de cultivo (FRANCO, A. L. C., LÔBO, I. P., Cruz, R. S. D., TEIXEIRA, C. M. L. L., ALMEIDA NETO, J. A. D., & MENEZES, R. S., 2013).

Considerando que o custo de separação da biomassa, pode ser responsável pela elevação de custo total da produção de biodiesel, é necessário escolher um processo de separação adequado ao tipo de microalga cultivado, porém é importante que seja um método simples e de baixo custo (MOLINA-GRIMA, et al. 2003; GONZALEZ-FERNANDEZ; BALLESTEROS, 2012).

### 2.1.4 Extração de óleo de microalgas.

O principal desafio no processo de extração de óleo de microalgas é maximizar o teor de óleo extraído (MECER e ARMENTA, 2011). Em função disso, após a separação da biomassa de microalga do seu meio de cultivo, são necessárias etapas de pré-tratamento da biomassa para melhorar a eficiência da extração do óleo. Esses processos consistem na ruptura da estrutura celular por ultrassom, micro-ondas, autoclave, moinho de pérolas, dentre outros, na secagem por aquecimento, resfriamento ou *spray* e na diminuição do tamanho das partículas através de moagem e peneiração (HALIM, DANQUAH E WEBLEY, 2012).

Para extrair o óleo das microalgas podem ser usados diferentes métodos mecânicos ou químicos. Os procedimentos mais utilizados nesse processo são: prensagem mecânica, homogeneização, extração com solvente, extração com fluido supercrítico, extrações enzimáticas, extração por ultrassom e choque osmótico (CHISTI, 2008). Desses procedimentos destaca-se a de extração do óleo com utilização de solventes que é uma técnica de extração de óleos vegetais

utilizada desde meados do século XIX (MANSANO, 2011). A literatura apresenta vários trabalhos utilizando diversos métodos de extração de óleos de microalgas com vários tipos de solventes (LEMÕES, 2011; MALEKZADEH et. al., 2016).

## 2.2 Biodiesel de microalgas

Em 1980 surgiu a primeira patente a nível mundial, de biodiesel e de querosene vegetal de aviação (Patente PI – 8007957, 1980), com os trabalhos do professor Expedito Parente, da Universidade Federal do Ceará, que é autor da mesma. (PARENTE, 2003). Essa patente foi relevante para o desenvolvimento de pesquisas na área de bicompostíveis.

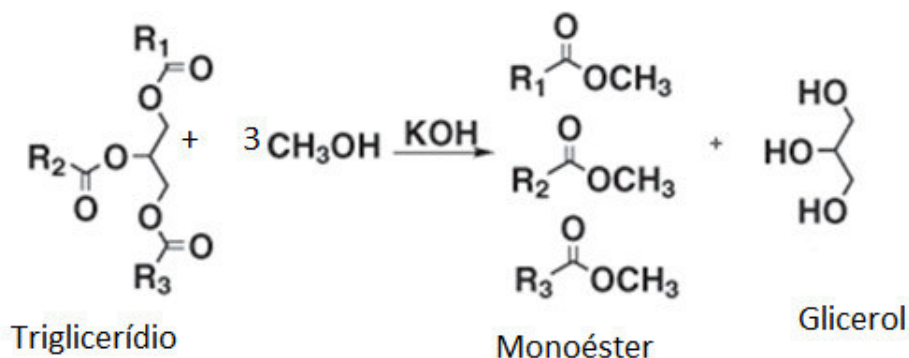
Biodiesel pode ser definido como bicompostível renovável e biodegradável, obtido de várias fontes renováveis como óleo de soja, girassol, mamona e canola ou de gorduras animais como sebo bovino. A Resolução n° 45, publicada no Diário Oficial da União em 26.8.2014, da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Bicompostíveis define biodiesel tecnicamente como “compostível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de ácidos graxos provenientes de gorduras de origem vegetal ou animal, desde que atenda a especificação proposta no regimento dessa resolução (ANP, 2014).

O processo de transesterificação de óleos ou gorduras depende da quantidade e tipo de catalisador e do álcool utilizado. Para cada molécula de triglicerídeo são formadas três moléculas de monoéster de ácido graxo e uma molécula de glicerol. Quando a reação é incompleta, aparecem triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos no meio reacional (ALMEIDA NETO, 2000).

Para ocorrer o processo de transesterificação necessita-se 1 mol de álcool de cadeia curta para 1 mol de ácido graxo, porém há necessidade de um excesso de álcool para acontecer para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação do monoéster. A Figura 4 representa a reação de transesterificação dos ácidos graxos com metanol utilizando hidróxido de potássio como catalisador.



**Figura 4** - Esquema geral da reação de transesterificação de um triglicerídeo com metanol



Fonte: Mota; Silva; Gonçalves, 2009

Segundo Atabani et al., (2012), o setor de transporte é responsável por, aproximadamente, 60% da demanda mundial de petróleo. De acordo com a Empresa de Pesquisa Energética do Ministério de Minas e Energia (2014), dentre os combustíveis utilizados no setor de transporte no Brasil, o diesel apresenta a maior demanda. Porém, é sabido que se trata de um combustível proveniente de matéria-prima não renovável e altamente poluente.

Atualmente existe uma grande preocupação com poluição ambiental causada pela queima de combustíveis fósseis. De acordo com Duarte Filho et al. (2009), o aproveitamento da biomassa é uma interessante estratégia para suprir problemas de ordem econômico e ambiental gerados pelo uso de combustíveis fósseis como o diesel. Neste contexto o biodiesel é uma alternativa viável para substituição do diesel, porque é renovável, emite menos gases poluentes, possui maiores lubrificidade e número de cetano e tem características similares ao diesel, permitindo a total ou parcial substituição em motores a diesel. (LUO, 2013; LEŠNIK, 2013; ROY, 2013; HOLANDA, 2004).

No Brasil a utilização de biodiesel para substituir o diesel demonstra grandes vantagens como: reduz a poluição ambiental, propicia alternativa de trabalho e renda para todas as regiões, proporciona a produção de energia elétrica descentralizada para comunidades isoladas, além de favorecer a redução dos gastos com serviços de saúde (MME, 2014).

Atualmente as principais oleaginosas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil são soja e algodão. (ANP, 2016). Para Christi (2007), o plantio das

oleaginosas tradicionais requer áreas maiores em comparação as áreas necessárias para o cultivo de microalgas. A Tabela 4 apresenta uma comparação do rendimento de óleo entre oleaginosas e microalgas.

**Tabela 4** - Rendimento anual de óleo de oleaginosas e microalgas por área

Cultura	Rendimento anual de óleo		Área necessária (mha)
	(L/ha)	(L/m <sup>2</sup> )	
<b>Milho</b>	172	0,02	1540
<b>Soja</b>	446	0,04	592
<b>Canola</b>	1.190	0,12	223
<b>Coco</b>	2.689	0,27	99
<b>Óleo de palma</b>	5.950	0,60	45
<b>Microalga A</b>	136.900	13,69	2
<b>Microalga B</b>	58.700	5,87	4,5
<b>Microalga C</b>	19.567	1,96	13,6

Fonte:Chisti, 2007.

Para produzir biodiesel pela rota de transesterificação, geralmente faz-se necessário uma etapa prévia de extração do óleo, que é um desafio tecnológico ainda a ser vencido no que se refere a utilização de microalgas. Devido a essa dificuldade muitos estudos estão sendo realizados utilizando a tecnologia de transesterificação direta ou *in situ* a partir da biomassa seca de microalgas. A transesterificação direta da biomassa de microalga pode apresentar como vantagens a eliminação das etapas de extração e purificação do óleo (LEWIS; NICHOLS; MCMEEKIN, et al., 2000), esta etapa pode ser realizada simultaneamente a de transesterificação (HAKALIN,2014), reduzindo o tempo de reação e o custo de produção. Além do que, todos os ácidos graxos - mesmo aqueles presentes em pequenas quantidades com extremidade polar (como os lipídios ligados às proteínas), que geralmente não compõem um extrato oleoso são convertidos a ésteres de ácidos graxos.

## 2.3 Catálise

A catálise estuda as alterações da velocidade de um processo químico provocada pela adição de catalisadores, os quais não são consumidos na reação. De acordo com Figueiredo e Ribeiro (1989), a temperatura, pressão, composição, tempo de contato e a utilização de catalisadores são variáveis que permitem o controle da velocidade e direção de uma reação química.

Nas reações químicas os catalisadores utilizados podem ser: homogêneos ou heterogêneos. Na produção de biodiesel geralmente predominam os catalisadores homogêneos, sendo que os mais utilizados são as bases fortes (como hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH), que diminuem significativamente o tempo de reação em baixas temperaturas, além da grande disponibilidade no mercado e preços acessíveis (LAM, LEE e MOHAMED, 2010; STOJKOVIĆ et al., 2014).

Segundo Stojković et al., 2014; Eze, Harvey e Phan, 2015 esse tipo de catalisador apresenta algumas desvantagens, dentre as quais pode-se citar: a alta probabilidade de competição com a reação de saponificação (formação de sabão), diminuindo o rendimento, além da necessidade de purificação do biodiesel, que requer uma neutralização com ácido. Na reação para produção de biodiesel podem ser utilizado catalisadores ácidos e básicos. Para Galadima e Muraza (2014), os catalisadores ácidos, quando comparados aos catalisadores básicos, em condições reacionais similares apresentam a vantagem de não reagirem com ácidos graxos livres para formação de sabão e a desvantagem de ter atividade catalítica menor.

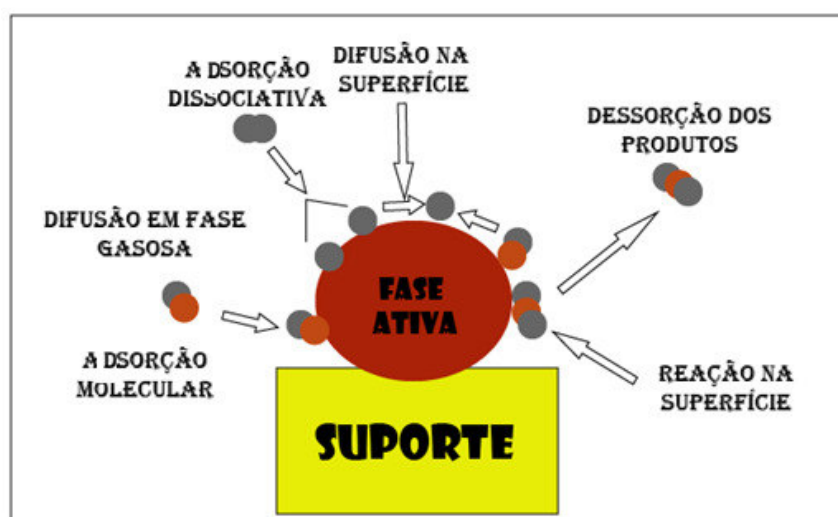
Os catalisadores heterogêneos apresentam uma boa atividade catalítica, requer menos etapas de purificação, produz glicerina com qualidade superior, podese facilmente separado do meio reacional, são sólidos e podem ser reutilizados promovendo um grande benefício ambiental e econômico (AHMED et al., 2013; REYERO, ARZAMENDI e GANDÍA, 2014).

De acordo com Figueiredo & Ribeiro (1989), existem dois tipos de catalisadores heterogêneos, o catalisador que a massa é formada por substâncias

ativas (catalisador mássico) e o catalisador que apresenta um suporte com uma superfície onde a substância ativa é dispersa no mesmo (catalisador suportado).

Segundo Tavares (2010), na reação catalítica heterogênea com catalisador sólido suportado os reagentes passam por difusão em fase gasosa ou líquida, posteriormente suas moléculas são adsorvidas na superfície do catalisador onde estão os sítios ativos que processam a reação. Depois acontece a adsorção dissociativa das moléculas dos reagentes e em seguida a difusão superficial formando os produtos que são dissolvidos para o meio reacional, isso ocorre de forma sucessiva até que todas as moléculas dos reagentes sejam consumidas. A Figura 5 representa o processo descrito.

**Figura 5-** Esquema geral do processo de uma reação com um catalisador sólido suportado



Fonte: Elaborada pela autora

### 2.3.1 Preparação de Catalisadores Sólidos

O método e preparação de um catalisador sólido e as propriedades do material utilizado são fatores que influenciam de forma direta nas propriedades desse catalisador. Dentre vários métodos de preparação de catalisadores sólidos o método dos precursores poliméricos com base no método Pechini (PECHINI, 1967) apresenta maior controle estequiométrico na síntese das matérias, alta estabilidade do material preparado e fases mais puras (MACIEL, SCHREINER, et al., 2003; GIRALDI et al., 2006). O método Pechini se resume na formação de

polímeros solúveis em meio aquoso contendo cátions metálicos. Para obtenção de catalisador por esse método, inicialmente ocorre a reação do cátion metálico com um ácido carboxílico (ácido cítrico) para formar um quelato metálico. Posteriormente, o quelato metálico reage com um poliálcool (etilenoglicol), para formar um poliéster, o que caracteriza o precursor polimérico. (MACIEL, SCHREINER, et al., 2003; GIRALDI et al., 2006; PURGATO et al., 2009; FERREIRA, PASSOS e POCRIFKA, 2014), (HUANG et al., 2012; CHO et al., 2015; HUANG et al., 2015).

Muitos materiais têm sido utilizados na preparação de catalisadores sólidos heterogêneos, dentre os quais o CaO tem sido destaque por ser um material que possui uma boa atividade catalítica principalmente para reações de transesterificação pois apresenta sítios ativos básicos que é favorável a esse tipo de reação. A alumina também tem sido um material que tem se destacado como catalisador e como suporte catalítico para outros metais (WATKINS; LEE e WILSON, 2004; TAVARES, 2010 e ARCEO, 2012; SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2015).

### 2.3.2 Óxido de Cálcio

A literatura disponibiliza uma variedade de trabalhos utilizando o CaO puro ou modificado como catalisador em reações para produzir biodiesel (WATKINS; LEE e WILSON, 2004; TAVARES, 2010; SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2015; CHEN, REN e YE, 2014; WU et al., 2013; LEE, JUAN e TAUFIQ-YAP, 2015; MAHESH et al., 2015; SILVA 2015). O CaO é produzido pela decomposição de materiais que contém carbonato de cálcio, através da calcinação e apresenta uma estrutura cristalina cúbica de face centrada (MAHESH et al., 2015).

O óxido de cálcio (CaO) é uma substância química sólida cristalina de cor branca a temperatura ambiente. Nas condições normais de temperatura e pressão apresenta baixa solubilidade em água e gera soluções com elevado caráter básico, o que favorece o seu uso em diversas reações que necessitam de catalisadores alcalinos. É instável e quando entra em contato com o ar reage

espontaneamente com o  $\text{CO}_2$  sendo convertido a carbonato de cálcio (MIRGHIASI et al., 2014).

### 2.3.3 Alumina

Geralmente o termo alumina consiste no conjunto de sólidos iônicos obtidos pelo aquecimento das formas amorfas e cristalinas de hidróxido de alumínio e oxihidróxidos de alumínio. Segundo Castel (1990) e Santos et al. (2000), um fator determinante no desenvolvimento de vários tipos de alumina existentes no mercado é a existência de um grande número de oxihidróxidos de alumínio, diferentes entre as estruturas química e física.

A estrutura de uma determinada alumina depende do seu grau de hidroxilação. (CASTEL, 1990; SANTOS et al., 2000). As aluminas totalmente hidroxiladas correspondem aos trihidróxidos ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) e apresentam as formas cristalinas bayerita, gibbsita e nordstrandita. Em determinadas condições que impedem a incorporação de hidroxilas, ou sob tratamento térmico, são formados os oxihidróxidos, que são a boemita e a diáspora. A pseudo-boemita, um oxihidróxido pouco cristalino com água em excesso, é formada em substratos planares. Outras formas de alumina são estudadas, mas, não é comprovado se realmente são fases diferentes ou apenas distorções do retículo cristalino provocadas por impureza, ou água adsorvida (CASTEL, 1990). A alumina possui características que dependem de vários fatores, como forma cristalina, impurezas e microestrutura. Estudos já realizados mostram que existem sete fases cristalográficas principais da alumina, que são: alfa, gama, delta, eta, teta, kappa e chi, dependendo do precursor e da temperatura na qual o tratamento térmico é realizado.

A alfa-alumina é um óxido de alumínio totalmente anidro, obtida a partir dos hidróxidos de alumínio, ou oxihidróxidos, acima de  $1200^\circ\text{C}$ , se a temperatura aplicada for mais baixa, se formam as aluminas de transição, cada uma com suas respectivas propriedades. O aquecimento de uma gibbsita, por exemplo, a  $150^\circ\text{C}$  gera boemita micro cristalina, e a  $400^\circ\text{C}$  forma uma série de aluminas gama, incluindo os tipos chi, eta e gama. Em temperaturas mais altas, cerca de  $1000^\circ\text{C}$ , obtém-se uma série de aluminas delta; que contém poucos grupos OH incluindo

as variedades kappa, theta e delta, que são muito mais cristalinas que as aluminas da variedade gama. As gamas e eta-aluminas, raramente encontradas em fases puras, são conhecidas como aluminas ativadas e são as mais importantes cataliticamente, devido a distinção de suas propriedades de quimissorção (CASTEL, 1990; SANTOS et al., 2000). As aluminas de transição são estabilizadas por baixas energias de superfície, e a mais abordada pela literatura é a gama-  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , uma forma policristalina com alta área específica, possui propriedades estruturais e aplicações diversificadas, principalmente, na área da catálise (CASTEL, 1990; CASTRO e GOUVÊA, 2003; OIKAWA et al., 2004; TETTENHORST et al., 1980).

As aplicações da alumina mais atraentes nos últimos anos têm sido para materiais de revestimento, azulejos resistentes à abrasão e pigmentos, também é muito utilizada como catalisadores e suportes catalíticos, devido às variedades de estruturas cristalinas diferentes, baixo custo e por apresentar características físicas e químicas atraentes para essa finalidade. (BAUMANN et al., 2005; CASTEL, 1990; CASTRO et al., 2003; OIKAWA et al., 2004; SANTOS et al., 2000; ARCEO, 2012; OLIVEIRA, 2015). A alumina é muito utilizada como suporte catalítico, em função de ser um material de baixo custo e estruturalmente estável, podendo ser preparada com uma grande variedade de volume de poros e distribuição dos diâmetros de poros (CASTEL, 1990; TETTENHORST et al., 1980; SANTOS et al., 2000). No setor acadêmico as aluminas puras são bastante utilizadas há muito tempo, como catalisadores para reações que acontecem por ativação de ligações, por exemplo, hidrogênio-hidrogênio, carbono-hidrogênio e carbono-carbono. Essa característica coloca em evidência as propriedades químicas da superfície da alumina, que permitem que este material seja utilizado como catalisador em uma série de reações ácido-base, como: isomerização e epoxidação de olefinas, halogenação de aromáticos, desidratação de álcoois, entre outras (CASTEL, 1990; CASTRO et al., 2003; OIKAWA et al., 2004; SANTOS et al., 2000;).

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo Geral

Comparar o processo de transesterificação de lipídios da microalga *Chlorella sp* in situ e em extratos alcoólicos utilizando catalisador heterogêneo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o catalisador na proporção molar Alumina: Ca (1:3) tratado a 700°C, utilizando o método dos precursores poliméricos;
- Caracterizar estruturalmente e morfologicamente os catalisadores;
- Empregar catalisadores heterogêneos a base de alumina e cálcio para transesterificação do óleo da microalga *Chlorella sp*;
- Aplicar o planejamento fatorial no processo de transesterificação do óleo de *Chlorella sp*;
- Avaliar a atividade catalítica dos materiais obtidos na reação de transesterificação;
- Determinar o perfil cromatográfico dos óleos da *Chlorella sp* por catálise heterogênea.



## 4. EXPERIMENTAL

---

Nesse capítulo estão listados os reagentes, equipamentos, acessórios, bem como os métodos de análises que foram realizados nos seguintes laboratórios: Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental, Laboratório Central Analítica, Laboratório Central de Energia, Laboratório Programa de Qualidade de Alimentos e Água. Todos localizados no Campus Bacanga da UFMA.

### 4.1 Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados para a síntese do catalisador, síntese dos produtos e quantificação são listados a seguir:

- ❖ Ácido cítrico (Isofar 99,5%)
- ❖ Ácido nítrico (Isofar 65%)
- ❖ Alumina (ALUMAR 99.9%)
- ❖ Carbonato de dimetila (Aldrich  $\geq 99.0\%$ )
- ❖ Etileno glicol (Synth 99%)
- ❖ Metanol (MERK 99,8%)
- ❖ Nitrato de cálcio tetra hidratado (Aldrich  $\geq 99.0\%$ )
- ❖ Sílica gel 60 (SARDI)
- ❖ Hexano (MERK98,5 %), da
- ❖ Acetato de etila (MERK98,5 %)
- ❖ Ácido clorídrico (CQA 37,0 %)
- ❖ Éter etílico P. A. (Proquimios 99,5 %)
- ❖ Fenolftaleína P. A. (Reagen)
- ❖ Hidróxido de potássio P.A( Quimex 97,0%)

### 4.2 Aquisição da Matéria-prima

A Biomassa seca de microalgas da espécie *Chlorella sp*, foi doada pela Fazenda Tamanduá localizada no município de Santa Teresinha no interior da Paraíba)

### 4.3 Equipamentos utilizados

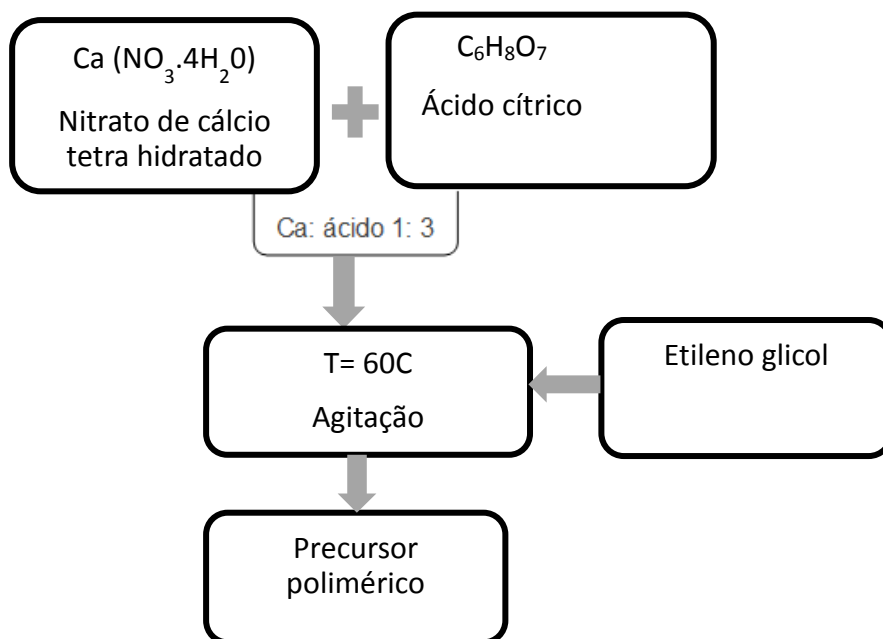
Os equipamentos utilizados para a síntese e caracterização do catalisador, extração do óleo, síntese, purificação e caracterização do biodiesel são listados a seguir:

- Dispersor ultrassônico, Ultra Turrax, T50 IKA.
- Forno Mufla. EDGCON 3P, EDG.
- Microscópio eletrônico de varredura, PhenonProX.
- Difratorômetro de raios X, D8 ADVANCED, Bruker.
- Rotaevaporador, HB 10, IKA.
- Infravermelho, IR prestige 21, SHIMADZU.
- Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, QP2010 Plus, SHIMADZU.
- Agitador Magnético, Modelo 752, FISATOM.
- Agitador Magnético com Aquecimento Modelo 258, FANEM.
- Manta de aquecimento, Q-321A25, QUIMIS.
- Balança DH AUS Precision Plus TP200.
- Espectrofotômetro de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda da Bruker, modelo S8 Tiger.
- Estufa, Q-317B32, QUIMIS.

### 4.4 Síntese do Catalisador

#### 4.4.1 Obtenção de precursor polimérico

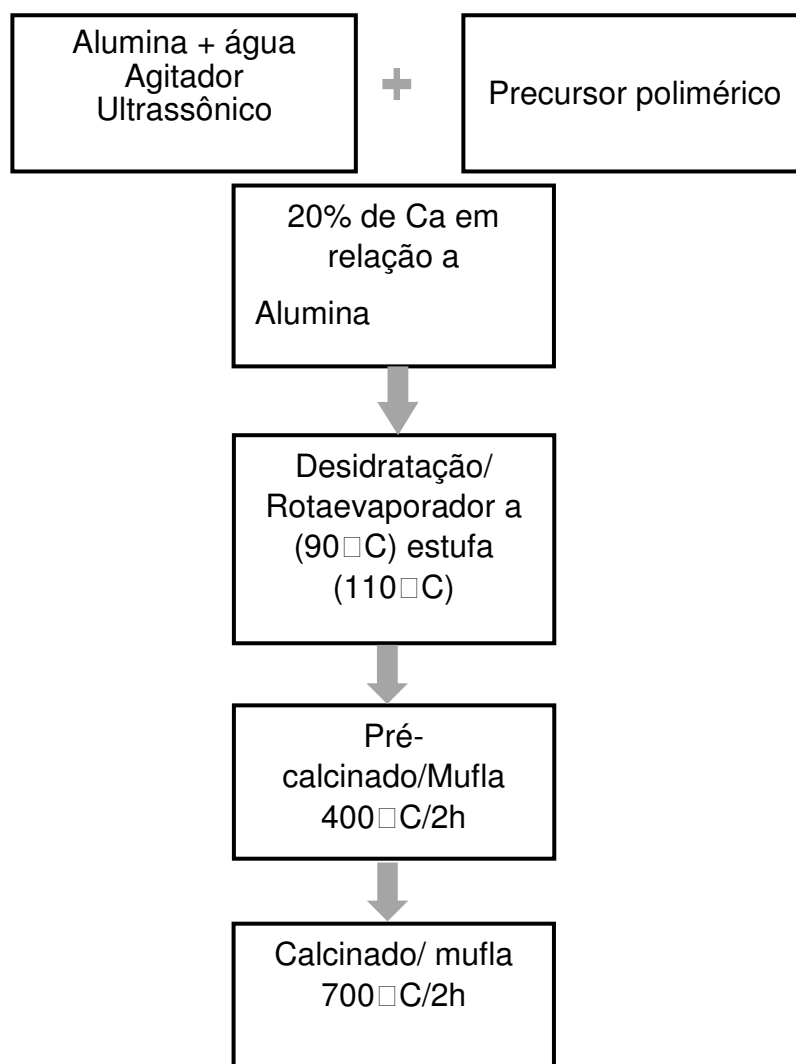
Para a obtenção do precursor polimérico adicionou-se 10 g de nitrato de cálcio tetra hidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ) em ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) na proporção de 1:3. A mistura foi colocada sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , neste ponto foi adicionado o etileno glicol na proporção de 1:1 em massa, relativo ao ácido cítrico, para formação do poliéster. O sistema permaneceu na temperatura de  $60^\circ\text{C}$  até obter-se uma consistência viscosa. A Figura 6 representa o fluxograma desse processo

**Figura 6-** Fluxograma do processo de obtenção do precursor polimérico de Ca

**Fonte:** Elaborado pela a autora.

#### 4.4.2 Modificação superficial da alumina com os metais

A alumina foi peneirada em peneiras com aberturas entre 140 (106  $\mu\text{m}$ ), 200mesh (75  $\mu\text{m}$ ), com o intuito de ocorrer uma melhor distribuição granulométrica do material e facilitando assim a modificação da superfície do mesmo. Para obter o catalisador de alumina modificado com cálcio, foi inicialmente feita dispersão ultrassônica da alumina em água destilada, a 6500 rpm por cinco minutos com um dispersor ULTRA TURRAX IKA<sup>®</sup> T 25 Digital, em seguida foi adicionado o precursor polimérico de forma a estabelecer uma proporção de 20% de cálcio em relação à alumina. Depois do processo de deposição, a água foi evaporada com temperatura por volta de 90°C em um rotaevaporador IKA RV10. Em seguida, foi feito um pré-tratamento térmico a 400°C por 120 minutos em forno mufla, onde ocorreu a degradação da matéria orgânica. Após resfriamento o material carbonizado foi desaglomerado em um almofariz de ágata e submetido ao tratamento térmico a 700°C por 120 minutos, onde foi eliminada a matéria orgânica residual. A Figura 7 representa o processo descrito.

**Figura 7-** Fluxograma do processo de obtenção do catalisador de alumina/ cálcio

Fonte: Elaborado pela a autora

## 4.5 Caracterização do catalisador

### 4.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho

As análises de Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um equipamento IR Prestige-21 da Shimadzu, onde o material foi solubilizado em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e a leitura foi realizada na faixa de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.5.2 Difração de Raios X

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi realizada, para identificação das fases cristalinas. Foram obtidos os difratogramas em um equipamento da marca PANalytical, modelo X'Pert Pro, usando radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), com intervalo de medida ( $2\theta$ ) de  $10-80^\circ$ , tamanho do passo ( $2\theta$ ) de  $0,013^\circ$  e  $0,395 \text{ s}$  por passo.

#### 4.5.3 Microscopia Eletrônica por Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

As análises da superfície foram feitas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com captura de imagens em um microscópio Phenon Pro X, acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) para analisa elementos que compõem o catalisador. A figura 6 demonstra resumidamente as cauterizações do catalisador.

#### 4.5.4 Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda

A composição elementar foi analisada em um Espectrofotômetro de Fluorescência de Raios X por dispersão de comprimento de onda da Bruker, modelo S8 Tiger, utilizando fonte de radiação de Ródio (Rh), potência geradora de  $30 \text{ kV}$ ,  $30$  corrente do tubo  $33 \text{ mA}$ , colimador  $0,23$  graus, cristal XS 55, detector selado, LLD  $1,0 \text{ ppm}$ , filmes Myler® ( $3,6 \text{ \mu m}$ ), recipientes de teflon e diâmetro da máscara  $34 \text{ mm}$ .

## 4.6 Extração de lipídios

### 4.6.1 Extração de lipídios de *Chlorella sp* com aquecimento

As extrações foram realizadas com base em um método descrito na literatura (ZHU, ZHOU E YU, 2002). As análises foram feitas em dois níveis diferentes, sendo que em um nível, inicialmente, pesou-se 5g da amostra da biomassa seca em 1 vidro de relógio e transferiu-se para um cartucho de celulose, levou-se a um aparelho de soxhlet, onde a amostra foi coberta com um pedaço de algodão desengordurado. Em seguida colocou-se 75 mL de solvente em balão de 100 mL previamente, pesado, lavado e seco em estufa a 105° durante 30 minutos. Conectou-se o balão em um sistema soxhlet e deixou-se em processo de refluxo a 60°C durante 6 horas. Após esse tempo o solvente foi evaporado e o balão foi levado para estufa a 60°C e resfriado em dessecador até atingir peso constante. O procedimento foi feito em triplicata e o cálculo do teor de lipídios foi realizado conforme a Equação 1. Os solventes utilizados foram hexano, metanol e hexano: metanol (1:2).

Os mesmos procedimentos foram realizados com o outro nível, onde se partiu de 50g de biomassa, 250 mL dos mesmos solventes, com as mesmas condições de tempo e temperatura. O mesmo procedimento de extração já citado foi feito utilizando a biomassa pré-tratada em banho de ultrasson. O pré-tratamento consistiu, em pesar a biomassa seca em um béquer e adicionar metanol na proporção 1:1 m/v. A mistura foi agitada em banho de ultrasson por 20 minutos.

Foi realizada também uma extração utilizando o reator parr, com o seguinte procedimento: No reator foi colocado 50 g de biomassa seca e 150 mL de metanol, nas condições de 60°C e 500 RPM por 30 minutos. Quando o sistema foi resfriado, a mistura foi colocada em um erlenmeyer onde foi adicionado 100 mL de hexano e colocado em agitação magnética durante 60 minutos. Posteriormente a mistura foi filtrada a vácuo utilizando funil sintetizado, o solvente foi evaporado, o balão foi levado para estufa a 60°C e resfriado em dessecador até atingir peso constante. O procedimento foi feito em triplicata e o cálculo do teor de lipídios foi realizado conforme a Equação 2. A Figura 8 representa o processo descrito acima.

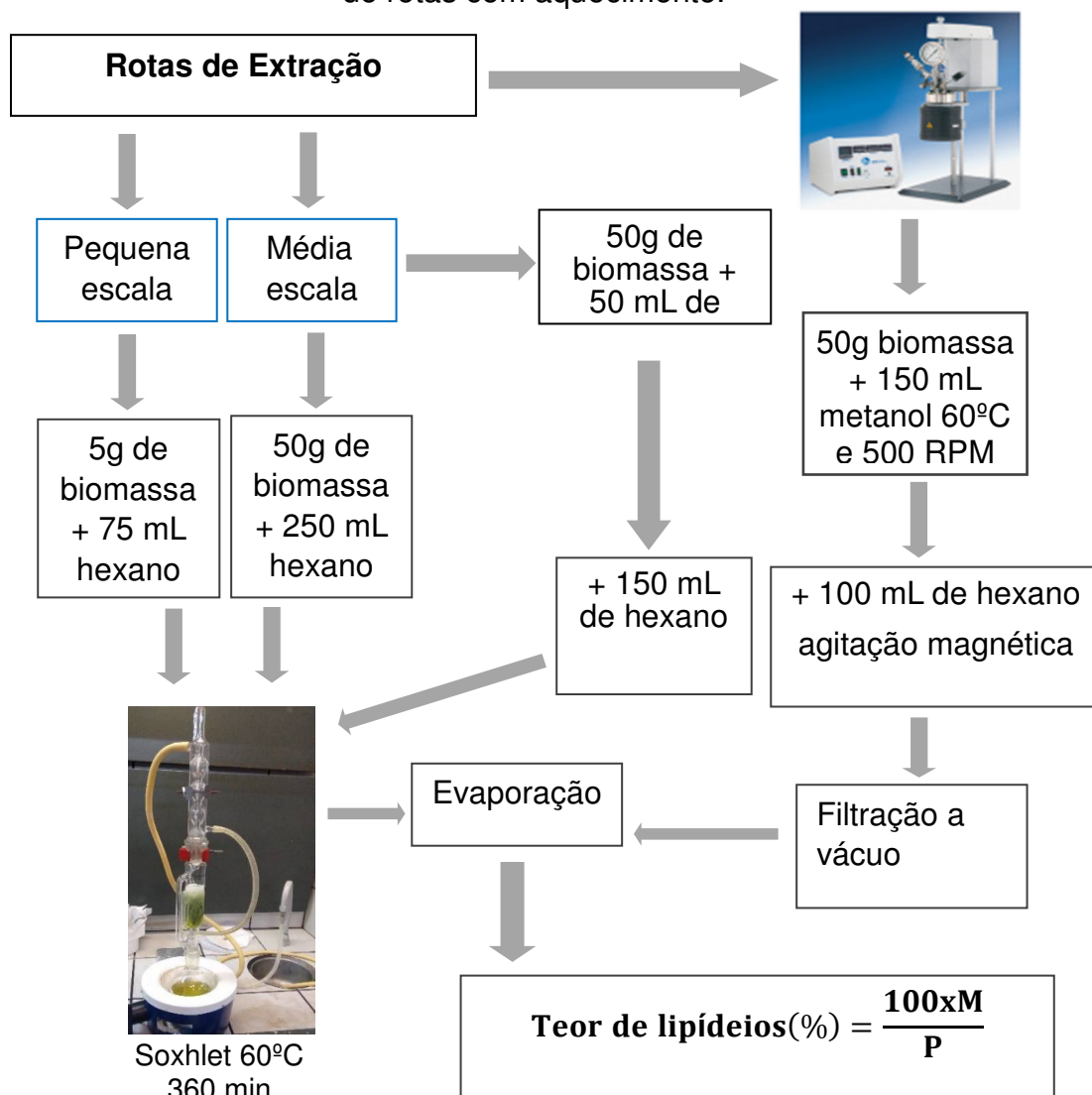
$$\text{Teor de lipídios}(\%) = \frac{100 \times M}{P} \quad (2)$$

Onde:

M = massa de lipídios em grama (g)

P = massa da amostra em grama (g)

**Figura 8-** Fluxograma da extração de lipídios da biomassa de *Chlorella sp* através de rotas com aquecimento.



Fonte: elaborado pela autora

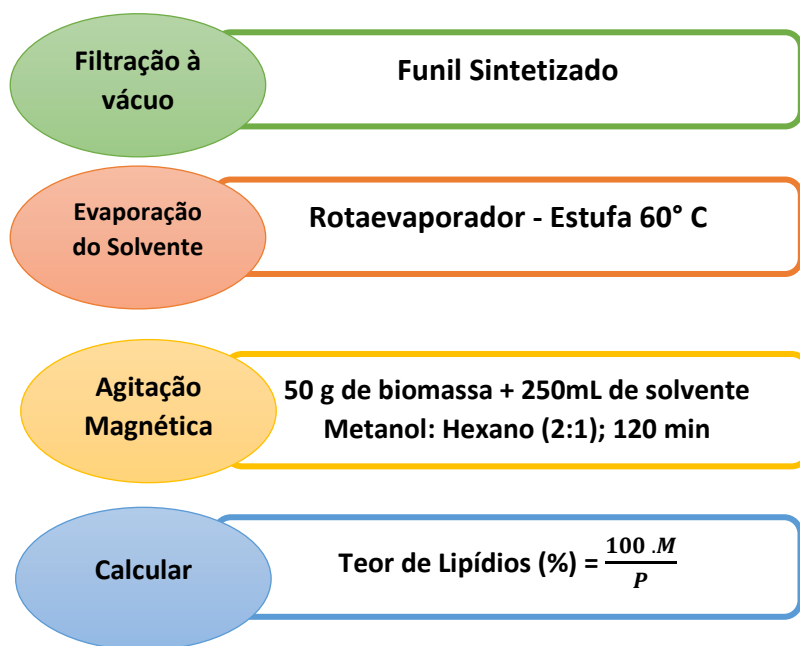
#### 4.6.2 Extração sem aquecimento

A extração foi realizada baseada no processo descrito na mesma literatura na seguida na extração com aquecimento, representado pela Figura 9, o processo foi realizado em erlenmeyer de 500mL a partir de 50g da biomassa seca e 250mL

de solvente. Os solventes utilizados foram metanol, hexano e a mistura de hexano: metanol (1:2 v/v), respectivamente. Após a adição de solvente, as amostras foram submetidas à agitação magnética por 120 minutos.

A fração do solvente contendo os lipídios foi separada da biomassa por 3 minutos de centrifugação e filtração a vácuo com a utilização de funil sinterizado, a biomassa foi lavada com solvente extrator, depois o solvente foi evaporado e a fração lipídica seca até peso constante em estufa a 60°C. Os ensaios foram realizados em triplicata, à temperatura ambiente e o rendimento foi calculado em porcentagem, em relação a massa seca utilizando a Equação 2.

**Figura 9-** Fluxograma da extração de lipídios da biomassa de *Chlorella sp* através de rota sem aquecimento



Fonte: elaborado pela autora



#### 4.6.3 Índice de Acidez (IA) da fração lipídica

Pesou-se 0,13 g da amostra em um erlenmeyer, adicionou-se 1,625 mL de solução de éter-álcool (1:1) previamente neutralizada com uma solução etanólica de hidróxido de sódio 0,1 mol/l. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de indicador fenolftaleína 1,0 % e titulou-se com solução de NaOH 0,1 mol/l até atingir a coloração rósea.

O cálculo baseia-se na equação:

$$IA = \frac{56,1 \times V \times M \times f}{m} \quad (3)$$

Os cálculos foram realizados com base na Equação 3.

*I. A.* = índice de acidez;

*V* = volume da solução de KOH, em mL;

*M* = molaridade da solução de KOH;

*f* = fator de correção da solução de KOH, *f* = 5,61;

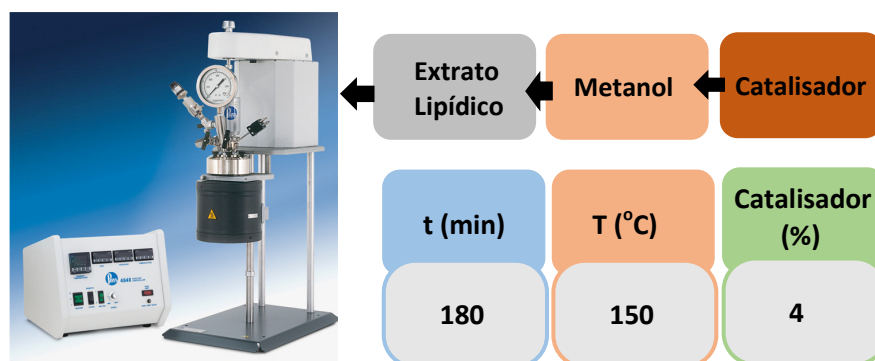
*m* = massa da amostra, em g.

#### 4.7 Reação de transesterificação

Todas as reações foram realizadas em um reator Parr com um controlador modelo 4848.

As reações dos extratos lipídicos foram realizadas partindo das proporções 1:15 m/v fração lipídica/metanol e 4% de catalisador Alumina/cálcio (em relação ao extrato lipídico). A reação procedeu-se em 180 minutos a uma temperatura de 150°C. Após o resfriamento do sistema, evaporou-se o excesso de metanol, adicionou-se 50 mL de hexano e a mistura foi submetida a agitação magnética por 60 minutos. Depois a mistura foi filtrada a vácuo para separar os insolúveis em hexano. A Figura 10 representa o processo descrito.

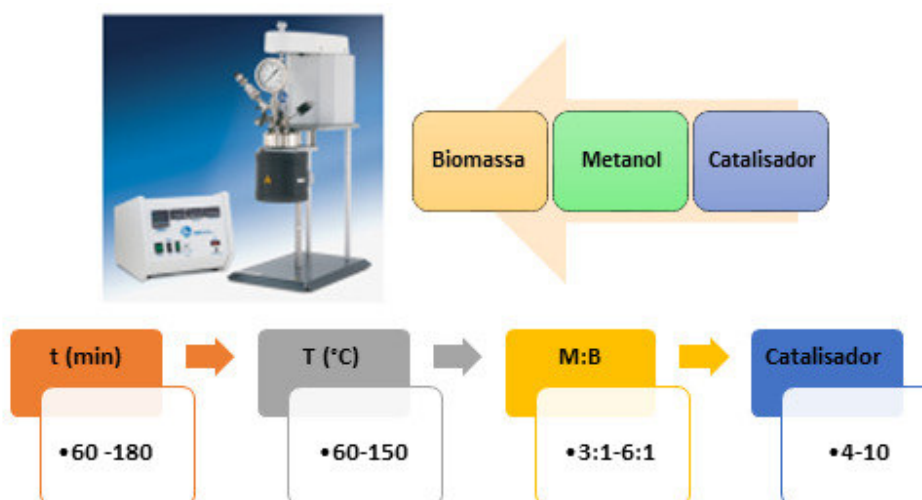
**Figura 10-** Fluxograma da reação de transesterificação do extrato lipídico



Fonte: elaborado pela autora

As reações de transesterificação *in situ* foram realizadas partindo de 50g de biomassa seca, variando, tempo, temperatura, concentração de catalisador em relação a biomassa e a razão molar metanol: biomassa, a Figura 11 representa um esquema da reação. Após o resfriamento do sistema, separou-se a fase líquida da biomassa por filtração a vácuo utilizando funil sintetizado, e o excesso de metanol foi evaporado. A fração dos ésteres e a biomassa residual foram tratados com 100 mL de hexano, sob agitação magnética durante 60 minutos e filtrados a vácuo para separar o material insolúvel em hexano. Após o tratamento e filtração, as duas fases foram misturadas em um balão e hexano foi evaporado.

**Figura 11-** Fluxograma da reação de transesterificação da biomassa de *Chlorella sp in situ*

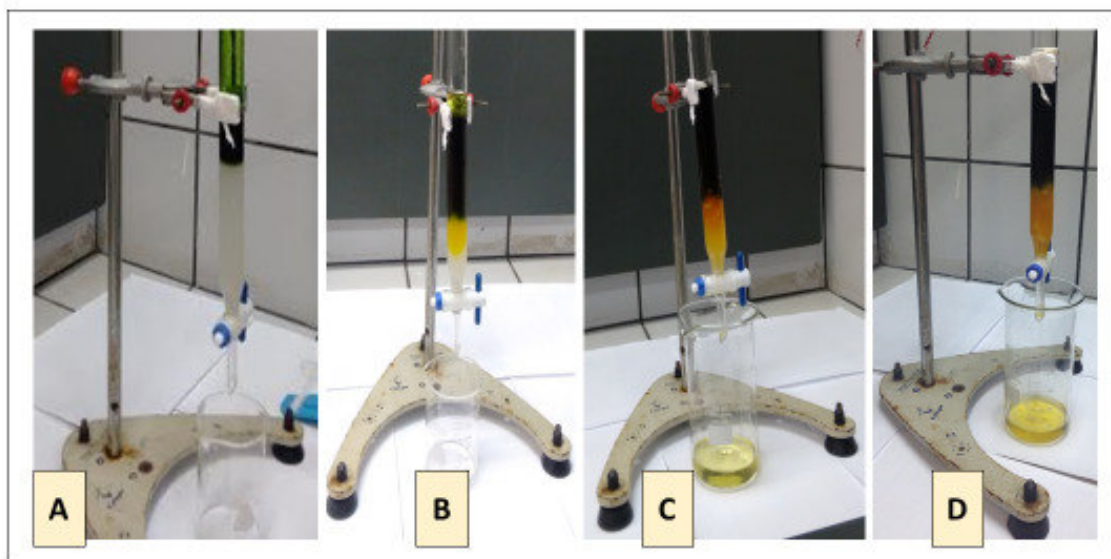


Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.7.1 Purificação do produto

O produto das reações dos extratos lipídicos e das reações *in situ* de *Chlorella sp* foram purificado sem coluna cromatográfica compactada com 15g de sílica Gel utilizando como eluentes, hexano e uma solução de hexano e acetato de etila a 1%. A purificação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada utilizando placas de sílica que foram reveladas com iodo (LEMÕES, 2011). O eluente foi separado do produto por evaporação. Todos os processos de evaporação foram realizados em um rotaevaporador IKA RV10. A Figura 12 representa o processo descrito, onde pode ser observado o fracionamento das substâncias na coluna na ordem seguinte: Figura 12(A) início do processo, Figura 12 (B) arraste fracionado das substâncias apolares com o eluente hexano, Figura 12 (C) e Figura 12 (D) saída dos ésteres sendo arrastados por uma solução de hexano com 1% de acetato de etila.

**Figura 12** - Colunas cromatográficas no processo de purificação dos ésteres



Fonte: Elaborada pela Autora

#### 4.7.2 Análise Cromatográfica dos ésteres

A identificação dos ésteres metílicos dos ensaios catalíticos do extrato de *chlorella sp* foi conduzida em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrometro de massas da Shimadzu, com uma coluna capilar (60m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura de filme). A amostra é introduzida em

um injetor Split/Splitless onde a coluna capilar faz a separação dos componentes (ésteres) individuais que são detectados pelo espectrômetro de massa, e seus espectros de massa podem ser mostrados, analisados e comparados a espectros padrão encontrados na biblioteca contida no equipamento. As condições instrumentais de análise são mostradas nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5-** Condições Cromatográficas (CG – EM)

Fluxo do Gás de Arraste (He)	1 mL /min
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura da fonte de ions	200 °C
Temperatura da interface	250 °C
Modo do MS	Full Scan
Intervalo de massas	30 a 500 m/z

**Fonte:** Elaborada pela autora

**Tabela 6-** Programa de temperatura do forno cromatográfico

Taxa de temperatura (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
0,0	70	2,0
15,0	180	3,0
0,7	230	0,0
3,0	250	8,0

**Fonte:** Elaborada pela Autora

Os ésteres dos ensaios catalíticos da biomassa *in situ* foram analisados em um Cromatógrafo a gás acoplado a um Espectrofotômetro de massas coluna capilar da ZB-FFAP (30m de comprimento 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme). A temperatura do forno foi 120 °C por 2 min, com rampa de aquecimento até 180 °C (10 °C/min), nova rampa de aquecimento até 230 °C (3 °C/min), permanecendo na temperatura final por mais 3 min. A temperatura do injetor e detector, ambos 250 °C, o fluxo do gás de arraste (H<sub>2</sub>) de 1mL/min e a Ratio Split de 100.

#### 4.8 Análise de proteínas da biomassa residual proveniente da extração de lipídios

A análise de proteína foi realizada no Laboratório Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água (PCQA) da Universidade Federal do Maranhão em São Luís. O método utilizado foi Kjeldahl, através da determinação de nitrogênio protéico. Onde inicialmente foi pesado aproximadamente 250mg de amostra e transferido para o tubo de digestão, foi adicionado 15g da mistura catalítica (1 parte de sulfato de cobre para 10 partes de sulfato de sódio), foi adicionado 20 mL de ácido sulfúrico P.A. e pérolas de vidro. Posteriormente, foi iniciada a digestão a baixa temperatura com elevação até 380°C. Após o resfriamento da mistura foi adicionado 250 a 350 mL de água destilada com agitação até dissolver a amostra. Adicionou-se 5 grânulos de zinco para controlar a ebulição e 150 mL de hidróxido de sódio a 50%. A mistura foi agitada e destilada de modo que o condensado fosse obtido a temperatura ambiente. Foi recolhido 200 mL do destilado em erlenmeyer de 300 mL contendo 30 mL de ácido bórico a 4% com 10 gotas de indicador (solução alcoólica de vermelho de bromo cresol). Foi titulado o material destilado com ácido clorídrico 0,1 mol/L até o ponto de viragem do indicador verde para rosa. O teor de proteína foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ proteina} = 100 \cdot \frac{0,014 \cdot 6,25 \cdot (V_a - V_b) \cdot F \cdot M}{P} \quad (1)$$

Onde:

P = massa da amostra em g;

V<sub>a</sub> = volume de HCl gasto na titulação;

V<sub>b</sub> = volume do HCl gasto na titulação da prova em branco;

F = fator de correção da solução de HCl;

M = Molaridade da solução de HCl;

6,25 = fator de transformação de nitrogênio em proteína, considerando 16 % de nitrogênio;

0,014 = miliequivalente grama de nitrogênio.

#### 4.9 Análise Estatística

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^4$  com 4 pontos centrais usando o Programa computacional Statistic 10.0 para construção do modelo empírico (Tabela7) a fim de avaliar a influência e as possíveis interações entre os fatores. As variáveis definidas foram: tempo, razão molar metanol/biomassa v/m, temperatura e concentração do catalisador. A definição das variáveis foi feita conforme pesquisa bibliográfica. (LEMÕES, 2011; CARRERO, 2015; CESCUT, 2011; MOUZINHO, 2007; HERNÁNDEZ, 2002).

**Tabela 7-** Planejamento fatorial  $2^4$  para o biodiesel de *Chlorella sp in situ*.

Ensaio	Tempo	Temperatura	Razão Metanol: biomassa (v:m)	Catalisador
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Fonte: Elaborada pela Autora

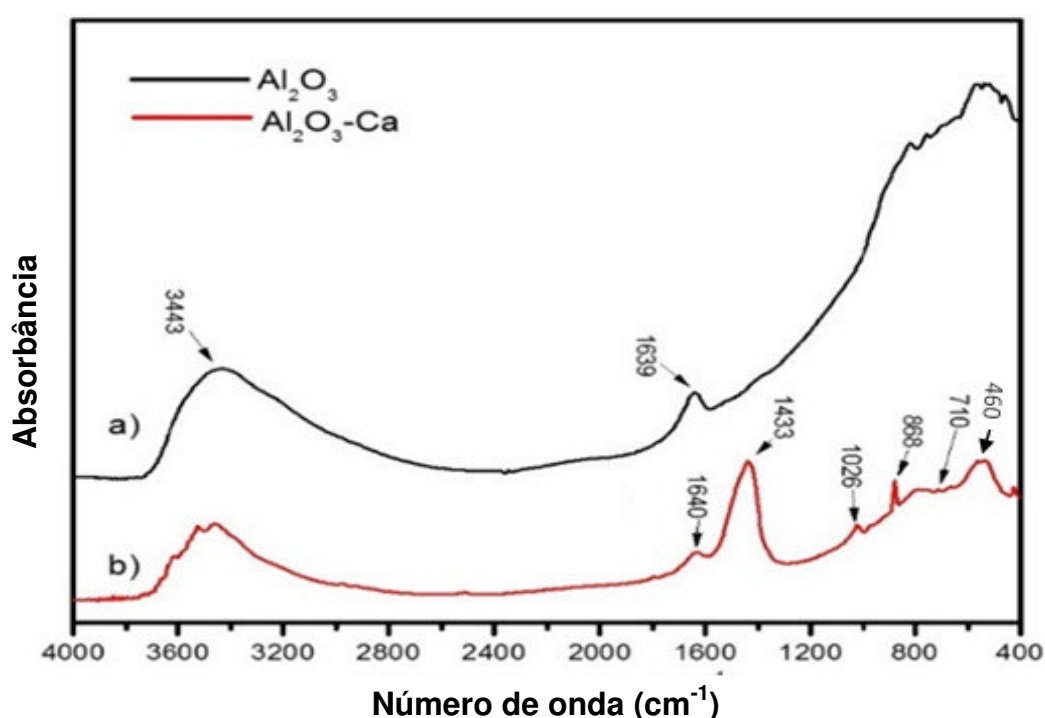
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do Catalisador

#### 5.1.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Na Figura 13, pode ser observado os espectros de infravermelho da alumina antes de ser modificada (a) e do catalisador  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Ca}$  (b) tratado a  $700^\circ\text{C}$ .

**Figura 13-** Espectro de FTIR a) alumina, b) alumina modificada com cálcio.



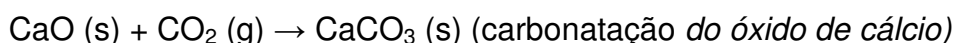
Fonte: Elaborada pela Autora

Os modos vibracionais nas regiões  $3443\text{ cm}^{-1}$ ,  $1639\text{ cm}^{-1}$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  é característica da ligação O–H atribuído às vibrações de estiramento e flexão dos grupos hidroxilas presentes em hidróxido de cálcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , água adsorvida e água coordenada (MOROS, et al., 2010 e GALVÁN-RUIZ, HERNÁNDEZ, BAÑOS, NORIEGA-MONTES e RODRÍGUEZ-GARCÍA 2009). Observa-se que os picos aparecem tanto no espectro da alumina quanto no espectro do catalisador Alumina-Ca, sendo que no catalisador os picos aparecem reduzidos, o que pode ser atribuído à eliminação de OH durante o tratamento térmico realizado a  $700^\circ\text{C}$ . Os modos vibracionais nas regiões abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  correspondem às

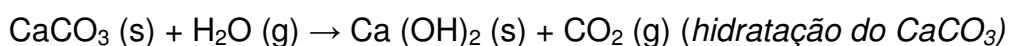
ligações de metais com oxigênio que pode ser atribuído às ligações de O-Al e O-Ca. O modo vibracional nas regiões  $1026\text{ cm}^{-1}$  e  $1433\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído a ligação C-O e na região  $1793\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído à ligação C=O que sugere a presença de carbonato de cálcio mais especificamente a fase calcita (MOROS, et al., 2010).

### 5.1.2 Difração de Raios X (DRX)

O gráfico padrão de DRX para a alumina e para o catalisador Alumina-Ca tratado a  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$  por duas horas é ilustrado na Figura 14 onde (14a) representa o difratograma da alumina e (14b) representa o difratograma do catalisador. Todas as fases foram indexadas com padrões de difração da base de dados Powder Diffraction File (PDF) do International Centre for Diffraction Data (ICDD), onde se identificou três fases cristalinas da alumina nas formas Tetragonal, Romboedral e Monoclínica, indexadas nas fichas, cujos números são 00-047-1770, 01-081-1667, 00-035-0121, respectivamente. Também foram identificadas as fases cristalinas nas formas, Cúbica, Romboedral e Hexagonal, relacionadas aos compostos, óxido de cálcio, carbonato de cálcio (calcita) e hidróxido de cálcio todas indexadas nas fichas de número, 00-044-1481, 00-037-1497 e 00-10-86-2339, respectivamente. Já era prevista a formação inicial da calcita, pois o tratamento térmico ocorreu em ar, e a formação dessa fase pode ser explicada pela presença de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que reage com o óxido de cálcio (CaO) que se forma inicialmente, resultando em carbonato segundo a seguinte reação:

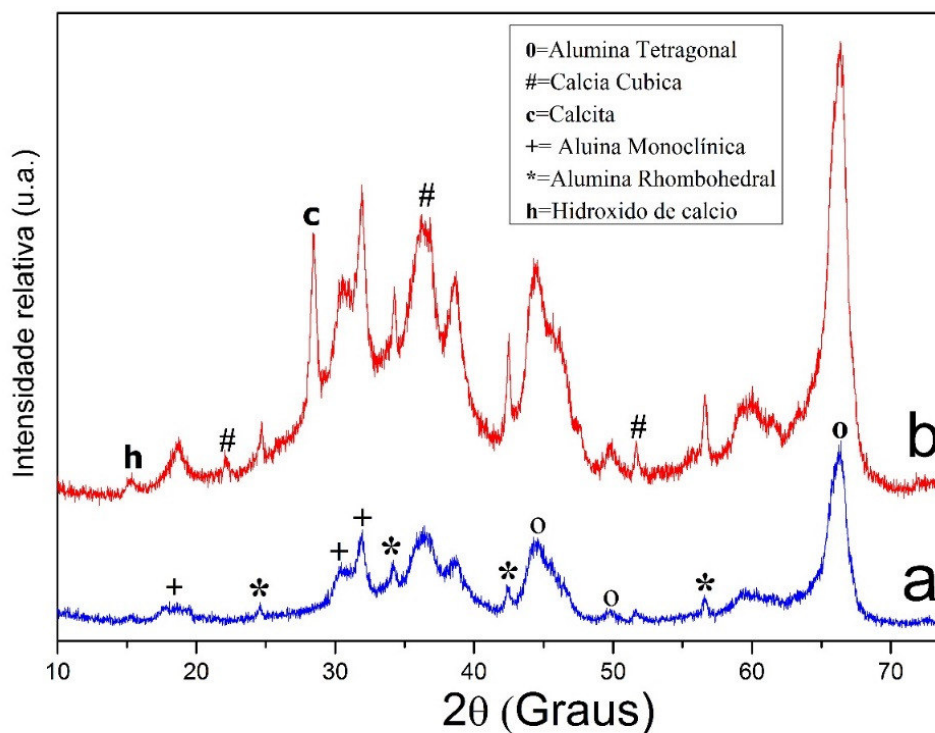


A formação da fase que sugere a presença do grupo hidroxila, pode ser explicada pela reação do  $\text{CaCO}_3$  com a umidade do ar que produz o  $\text{Ca (OH)}_2$  em função do material ter sido calcinado em presença de ar. A reação é indicada abaixo:





**Figura 14-** Difratoograma de Raios X da alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (a) e catalisador  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaO}$  (b).

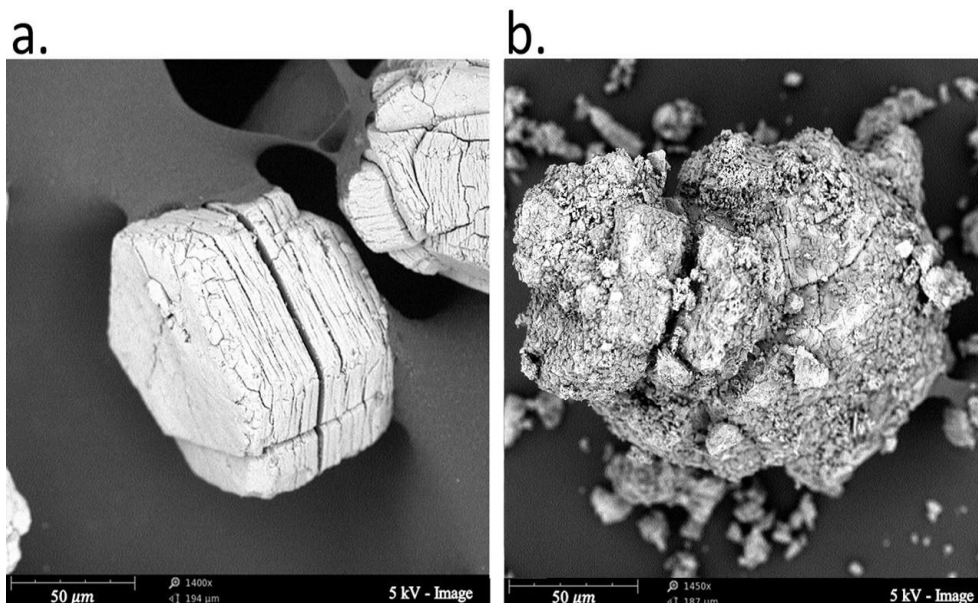


Fonte: Elaborada pela Autora

### 5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o objetivo de avaliar a superfície do material, obtiveram-se as imagens da alumina, ilustradas na Figura 15 onde, a) representa a micrografia alumina e b) representa a Micrografia da alumina modificada. Nas imagens a alumina observa-se fissuras enquanto que nas imagens da alumina modificada verifica-se que a estrutura é mais plana com poucas fissuras. Percebe-se ainda que o grão característico da alumina tem uma superfície homogênea quando comparada ao do catalisador ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaO}$ ), onde são observadas claramente, pequenas partículas depositadas no suporte.

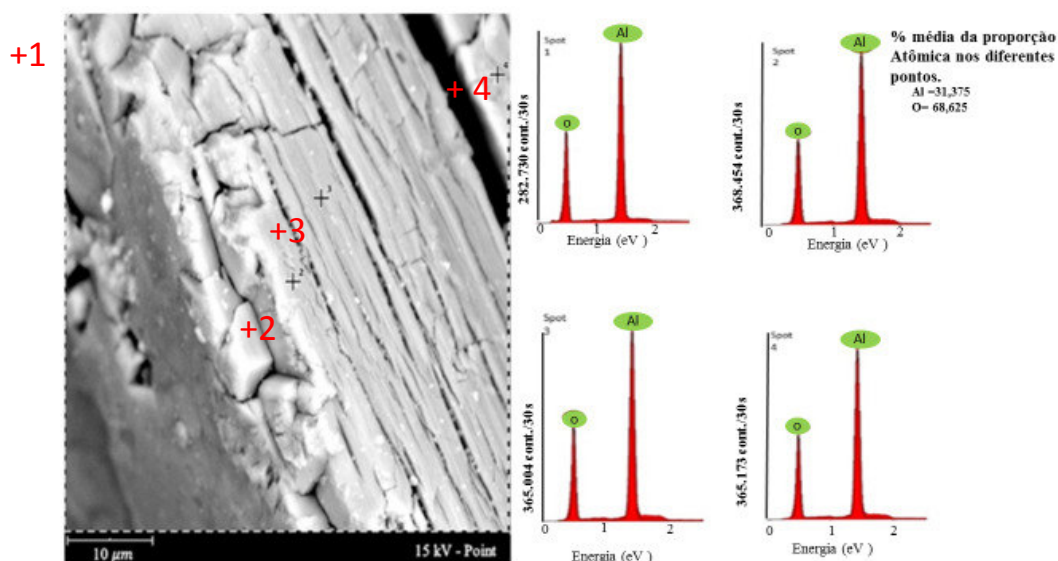
**Figura 15 - a) Micrografia alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e b) Micrografia da Alumina modificada (Al - Ca)**



Fonte: Elaborada pela autora

Para avaliação da composição elementar do catalisador foi utilizada a técnica de EDS, as Figuras 16 e 17 representam a composição de elementos no suporte (alumina) e no catalisador (alumina modificada).

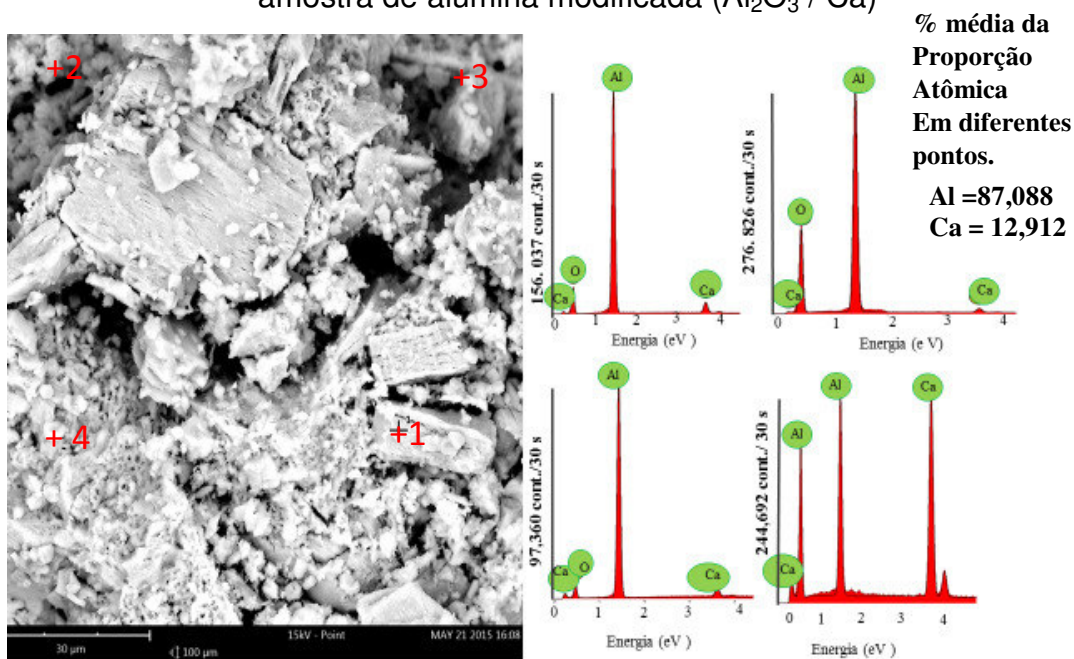
**Figura 16- Análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) na amostra de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )**



Fonte: Elaborada pela Autora

Na Figura 16, identifica-se a composição de quatro pontos da superfície de um grão da amostra de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), caracterizando-a quando apresentam em seus espectros apenas os elementos químicos alumínio e oxigênio, distribuídos de forma homogênea na região analisada.

**Figura 17-** Análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) na amostra de alumina modificada ( $\text{Al}_2\text{O}_3 / \text{Ca}$ )



Fonte: Elaborada pela Autora

Na Figura 17, identificou-se a composição de quatro pontos da superfície de um grão da amostra de alumina modificada, os quais caracterizam a mesma ao apresentarem em seus espectros os elementos alumínio, oxigênio e cálcio, que estão distribuídos de forma heterogênea na região analisada, haja vista que as quantidades dos mesmos diferem nos pontos selecionados. Como demonstrado na mesma figura são bastante diferenciadas, possuindo maiores valores nas áreas em que podem ser observadas, com maior facilidade, partículas depositadas na alumina.

#### 5.1.4 Fluorescência de raios X por Dispersão de Comprimento de Onda

A análise de fluorescência foi realizada no material, com o intuito de confirmar a presença dos elementos de interesse no mesmo, contudo evitar possíveis erros causados pela presença de matéria orgânica. As proporções molares teórica e experimental dos metais alumínio (Al) e cálcio (Ca) presentes no material sintetizado pelo método dos precursores poliméricos foram confirmadas. As proporções foram 84,87 % de Alumínio e 14,19 % de cálcio. Comparando ao resultado das análises no EDS verifica-se que as proporções encontradas foram diferentes, o que pode ser atribuído ao fato da análise de Fluorescência se realizada utilizando uma quantidade mais elevadas do que a análise de EDS onde são analisados apenas pontos da amostra.

### 5.2. Caracterização da biomassa

#### 5.2.1 Análise de lipídios da biomassa seca de *Chlorella sp*

Os resultados das extrações dos lipídios da biomassa de *Chlorella sp* é demonstrado na Tabela 8. Nessa análise pode-se observar que os menores rendimentos foram nas extrações com soxhlet sem pré-tratamento da biomassa, já na extração em soxhlet tem que a biomassa foi misturada com metanol e agitada em ultrassom por 90 minutos, houve aumento no rendimento, o que pode ser atribuído ao rompimento das paredes celulares através do choque provocado entre as células, facilitando a penetração do solvente para extração dos lipídios. Esse fator, também pode explicar o rendimento do método por agitação magnética e por agitação no reator, sendo que no reator ainda teve o fator temperatura que pode ter influenciado no rendimento.

As microalgas são constituídas de lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios) que se concentram na parede celular e os lipídios neutros (monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos), que se concentram no interior da célula. Os lipídios neutros são convertidos em ésteres nas reações de esterificação ou transesterificação. Devido a existência dos lipídios polares e neutros na constituição da microalga, utilizou-se mistura de solventes polar e

apolar, no processo de extração de lipídios com o intuito de extrair todo o teor de lipídios neutros existente na biomassa.

**Tabela 8-** Rendimento de lipídios extraídos em diferentes métodos utilizando os solventes, metanol, hexano e suas misturas

<b>Método de Extração</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Metanol (mL)</b>	<b>Hexano (mL)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Extrato lipídico (%)</b>
<b>Soxhlet</b>	5g	60		75	360	<b>0,93</b>
<b>Soxhlet</b>	5g	60	75	-	360	<b>1,05</b>
<b>Magnética</b>	50g	-	100	50	120	<b>7,2</b>
<b>Magnética</b>		-	150		120	<b>7,04</b>
<b>Ultrassom/ Soxhlet</b>	50g	55 no Soxhlet	150	100	90+360	<b>8,85</b>
<b>Reator Parr/ Agitação magnética</b>	50g	60 no reator	150	100	60+60	<b>11,36</b>

Fonte: Elaborada pela Autora

### 5.2.2 Índice de acidez da fração lipídica

De acordo com Alonso, et. al. (1998), as frações lipídicas extraídas de microalgas são constituídas principalmente de ácidos graxos, fosfolipídios, glicolipídios, além de outros lipídios polares. Esse fator influencia para que o índice de acidez dos lipídios de microalgas seja elevado.

O índice de acidez, consiste na quantidade de mg de hidróxido de potássio necessária para neutralizar ácidos graxos livres presentes em 1g de amostra. Para realizar as reações de transesterificação, se faz necessária a determinação do índice de acidez das matérias primas a serem transesterificadas. Conforme a literatura, para produzir biodiesel por transesterificação alcalina não é indicada matéria prima com índice de acidez superior a 2,0 mg KOH /g de amostra, pois índice de acidez elevado, significa grande quantidade de ácidos graxos livres que reagirão com o catalisador formando sabão no meio reacional reduzindo o rendimento da reação.

Geralmente em matérias primas com altos índices de acidez é realizada a esterificação dos ácidos graxos livres na presença de catalisador. Na esterificação ocorre formação de água que inibe as reações de esterificação e transesterificação acontecendo a hidrólise dos ésteres obtidos ou utiliza-se um catalisador ácido para evitar a formação de sabão. Catalisador ácido apresenta o problema de corrosão além de ser menos eficiente do que o catalisador básico.

Nesse trabalho, foi realizado o índice de acidez na fração lipídica extraída com metanol e hexano e o valor foi 10 mg de KOH/ g de amostra. O valor encontrado está acima do padrão estabelecido na literatura para os óleos vegetais, porém na literatura encontra-se trabalhos em que o índice de acidez foi mais elevado. Lemões, 1998 analisou o índice de acidez em extrato lipídico de *Chlorella sp* extraído com hexano e obteve um valor de 112,76 mg/g e em extrato lipídico extraído com metanol e clorofórmio obteve índice acidez de 39,39 mg/g.

### 5.3 Análise Estatística

Foi realizado um planejamento experimental fatorial  $2^4$  para o processo de transesterificação de óleo de *Chlorella sp in situ*. No modelo variou-se, o tempo de reação, a temperatura, a razão metanol/biomassa (v/m) e o percentual de catalisador, em relação a biomassa que foi fixada em 50g, obtendo como resposta o rendimento de biodiesel. Os fatores foram selecionados de acordo com a literatura. Na Tabela 10 são demonstradas as condições reacionais em que foram realizados os ensaios catalíticos e suas respectivas respostas (teor de ésteres). Comparando os ensaios 4, 12 e 16 que tiveram os rendimentos 79,38; 81,66 e 82,27, respectivamente, verifica-se que no ensaio 4 com uma concentração menor de catalisador obteve-se rendimento próximo do rendimento do ensaio 12 e comparando os ensaios 12 e 16 verifica-se que os rendimentos foram muito próximos sendo que em 12 foi utilizado uma quantidade menor de metanol.

**Tabela 9- Ensaios catalíticos da reação do óleo da biomassa de *Chlorella sp in situ* para produção de ésteres**

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Razão molar metanol/ biomassa v/m	Catalisador (%) m/m	Teor de Ésteres (%)
1	40	60	03:01	4	28,16
2	180	60	03:01	4	21,92
3	40	150	03:01	4	29,69
4	180	150	03:01	4	79,38
5	40	60	06:01	4	3,50
6	180	60	06:01	4	48,74
7	40	150	06:01	4	69,38
8	180	150	06:01	4	38,58
9	40	60	03:01	10	41,32
10	180	60	03:01	10	20,14
11	40	150	03:01	10	69,50
12	180	150	03:01	10	81,66
13	40	60	06:01	10	4,57
14	180	60	06:01	10	77,69
15	40	150	06:01	10	42,76
16	180	150	06:01	10	82,27
17 (C)	110	105	4,5:1	7	51,19
18 (C)	110	105	4,5: 1	7	53,53
19 (C)	110	105	4;5: 1	7	55,35
20(C)	110	105	4,5:1	7	52,48

Fonte:Elaborada pela autora

### 5.3.1 ANOVA

A análise de variância (ANOVA), foi utilizada com o intuito de avaliar os resultados obtidos na otimização da síntese de ésteres direto da biomassa seca de *Chlorella sp*. A mesma permitiu a demonstração dos fatores que realmente produziram efeitos significativos no sistema e os resultados são demonstrados na Tabela 10. A resposta foi ajustada aos fatores através do modelo linear mostrado na equação 4, onde as variáveis independentes são representadas pelo tempo (t), temperatura (T), razão (R) metanol: biomassa e concentração de catalisador (C). O modelo apresenta linearidade considerando que o F-calculado é maior que o F-tabelado na regressão, porém não se observou a falta de ajuste. Portanto a faixa de trabalho não foi adequada nas reações de síntese da biomassa de *Chlorella sp* (NETO BARROS, SCARMINIO, ROY, 2001).

$$Y = 47,33 + 10,09t + 15,44T - 0,26 R + 6,28C \quad (4)$$

**Tabela 10** - Anova e resultados da regressão de análise fatorial completo para produção de ésteres da biomassa de *Chlorella sp. situ*

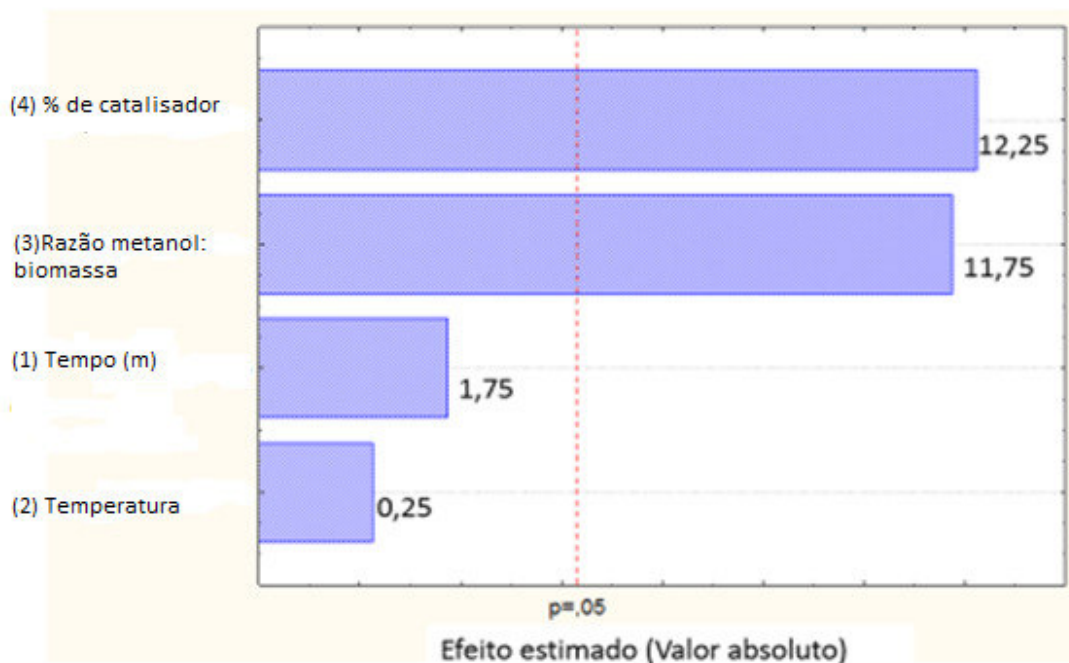
Fonte de Variância	Soma Quadrática	Nº Grau Liberdade	Média Quadrática	F-calculado	F-tabelado
Regressão	6106,16	3	2035,39	5,75	0,11
Resíduo	5310,39	15	354,03		
Falta de Ajuste	2846,93	13	218,99	50,36	0,26
Erro Puro	8.7	2	4.35		
<b>Total</b>	<b>11416,55</b>				
	% de variância explicada:		0,53		
	% de variância máxima explicada:		0,99		

**Fonte:** Elaborada pela Autora

No gráfico de Pareto (Figura 18), pode-se observar que as variáveis - concentração de catalisador e a razão metanol/biomassa foram os principais fatores que influenciaram no aumento do teor de ésteres, considerando que as barras que correspondem a essas variáveis, ultrapassam a linha pontilhada, que corresponde o grau de confiança de 95%. O comprimento das barras é proporcional ao valor absoluto das estimativas dos efeitos.



**Figura 18-** Gráfico de Pareto das variáveis da reação de transesterificação in situ para otimização da síntese de ésteres.

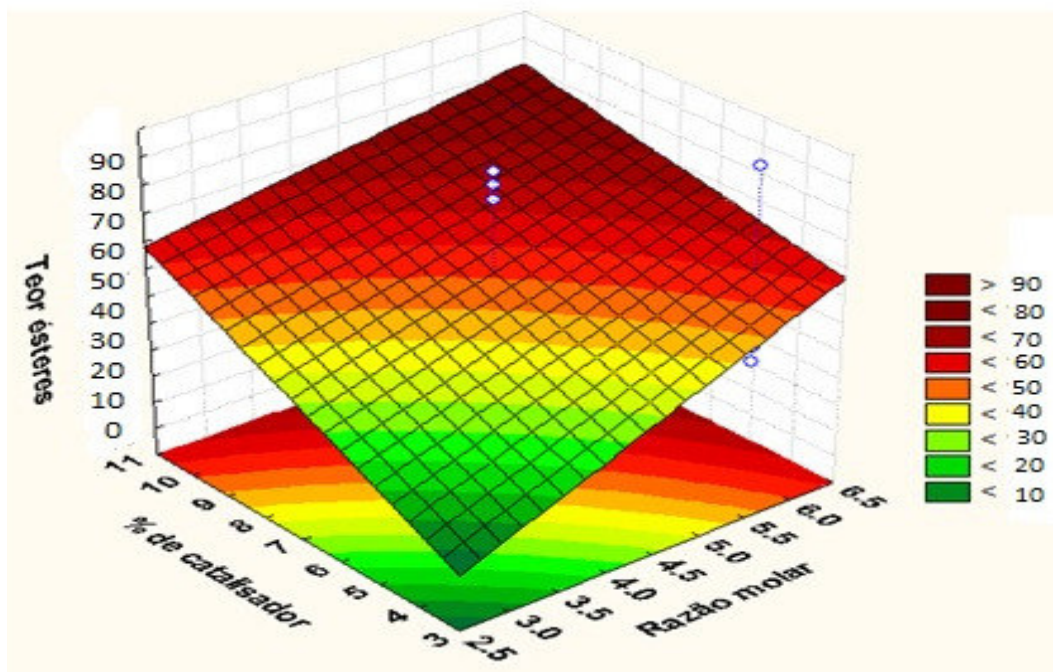


Fonte: Elaborado pela autora

### 5.3.2 Análise do teor de éster pela superfície de resposta

O gráfico da superfície de resposta foi analisado para estimar o processo de otimização da produção dos ésteres metílicos de *Chlorella sp* foram obtidas as condições mais adequadas para maximizar o rendimento em ésteres de *Chlorella sp in situ*. A Figura 19 mostra que os maiores valores dos teores de ésteres de *Chlorella sp in situ* foi influenciado estatisticamente pela razão metanol: biomassa e quantidade de catalisador. As melhores condições obtidas foram a razão metanol: biomassa 3:1, quantidade de catalisador 10%, temperatura 150 °C e tempo de reação 180 minutos para obter um teor de ésteres acima de 80 %.

**Figura 19-** gráfico da superfície de resposta e curva de contorno do biodiesel metílico de *Chlorella sp in situ* para a quantidade de catalisador e a razão metanol: biomassa.



Fonte: Elaborada pela autora

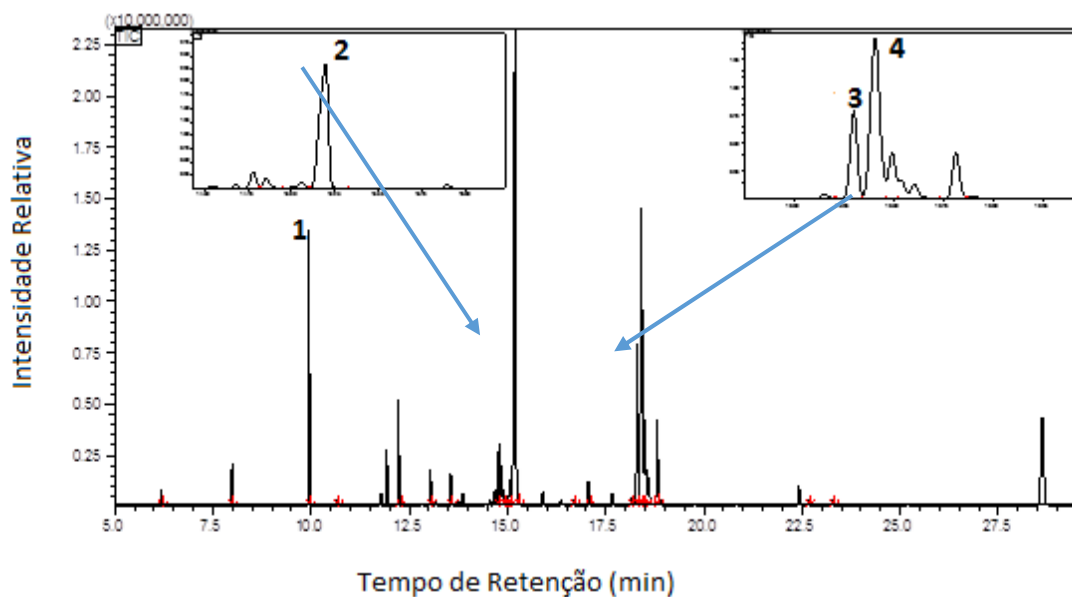
## 5.4 Caracterização dos ácidos graxos

### 5.4. 1 Análise cromatográfica

Após a purificação dos produtos por coluna cromatográfica filtrante foi determinado o teor de ésteres. A pesquisa dos constituintes das amostras foi realizada na biblioteca National Institute of standards and Technology (NIST 0.8) do CG-MS. Foi utilizado o método, Normalization Method (area normalization).

A Figura 20 corresponde ao cromatograma que demonstra o perfil cromatográfico do ensaio catalítico no extrato lipídico de *Chlorella*, onde se obteve um rendimento de 84,32%, foram considerados todos os ésteres de C8 a C23 observou-se que os ésteres metílicos que contém em maior quantidade são o Palmitato, Oleato, Linoleato, Laurato, representados na tabela 11. Contudo, apareceram outros os ésteres metílicos em quantidades menores como, Caprilato (C8:0), caproato (C10:0), palmitoleato (C17:1), ecosanoato (C21:1), aracdato (C21:0), berrenato (C23:0), margárico (C19:0), miristato (C15:0), estearato (C19:0) e caproato (C11:0).

**Figura 20-** Cromatograma do produto formado no ensaio catalítico com extratos lipídicos de *Chlorella sp*



Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 11-** Ésteres majoritários identificados nas análises da reação de transesterificação do extrato lipídico de *Chlorella sp*.

Número	Composto	Nº de Carbonos	RT	% Área
1	Laurato de metila	C13:0	10.1	9,6
2	Palmitato de metila	C18:0	15.1	34,67
3	Linoleato de metila	C19:2	18.3	8,38
4	Oleato de metila	C19:1	18.4	19,9

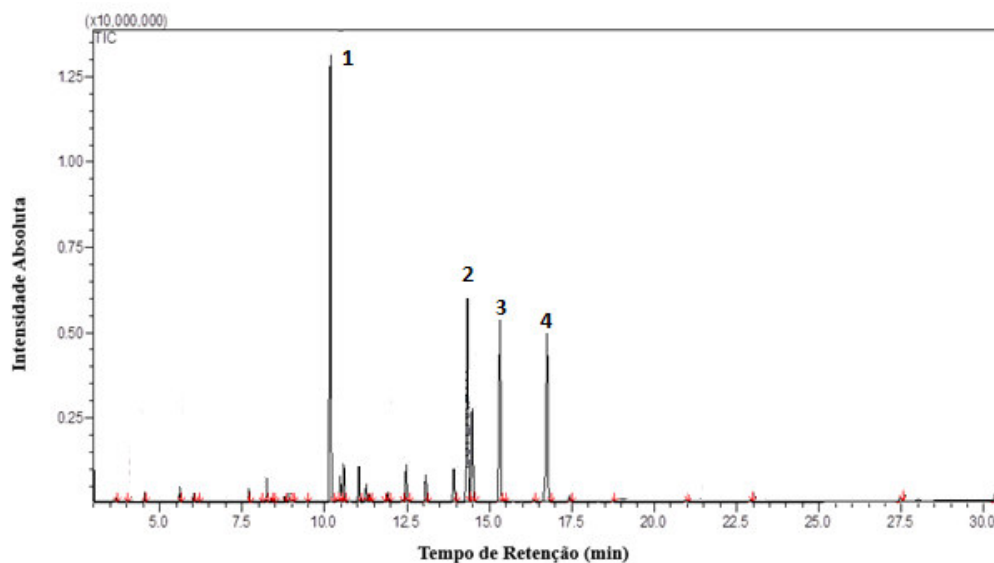
Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 21 corresponde ao cromatograma que demonstra o perfil cromatográfico do ensaio catalítico 16 nas condições demonstradas na Tabela 9 onde se obteve um rendimento de 82,27%, podendo-se observar que os ésteres metílicos que contém em maior quantidade são o Palmitato, Oleato, Linoleato, Linolenato. Contudo apareceram outros ésteres metílicos em quantidade minoritária como, palmitoleato (C17:1) Caproato (C11:0), Estearato (C19:0),

Berrenato (C23:0), Aracdato (C21:0) margarato (C19:0), Laurato (C14:0), eicosanoato (C21:1) e Miristato (C14:0).

Os ésteres majoritários nessa análise, bem como algumas informa sobre esses ésteres estão relacionados na Tabela 12.

**Figura 21**-Cromatograma do produto formado no ensaio catalítico 16 do planejamento fatorial para síntese de ésteres metílicos



Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 12**- Ésteres majoritários identificados nas análises da reação de transesterificação da biomassa de *Chlorella sp in situ*

Número	Composto	Nº de carbonos	RT	%Área
1	Palmitato de metila	C17: 0	10.791	22,77
2	Oleato de metila	C19: 1	14,811	14,19
3	Linolenato de metila	C19:3	16.698	12,75
4	Linoleato de metila	C19: 0	18.301	12,18

Fonte: Elaborada pela Autora

O melhor rendimento da reação da biomassa de *Chlorella sp in situ* (ensaio 16 – 82,27%) e o rendimento da reação do extrato lipídico (84,32%) foram

próximos sendo que, na reação da biomassa *in situ*, são eliminadas as etapas de extração, tornando o processo mais rápido com utilização de menor quantidade de solvente. De acordo com as condições empregadas nos ensaios 4 e 16 do planejamento observou-se rendimentos próximos na reação da biomassa de *Chlorella sp in situ*. No ensaio 4 a reação ocorreu com menor quantidade de catalisador e metanol, então fez-se uma reação isolada reduzindo apenas a razão metanol: biomassa de 3:1 para 2: 1, 4% de catalisador, temperatura de 150°C, o resultado do rendimento foi de 81,02% sendo satisfatório em relação ao ensaio 4, pois a razão metanol: biomassa influenciou positivamente no processo corroborando com o gráfico de pareto.

Os perfis cromatográficos do produto da reação do óleo de *Chlorella sp* e do produto da transesterificação direta, são semelhantes. Ambos apresentaram ésteres metílicos saturados e insaturados, porém no produto da transesterificação *in situ* apresentou uma quantidade de linolenato acima do permitido pela norma EN 14214 que estabelece o máximo 12 % para a composição de linolenato no biodiesel.

### **5.5 Análise de proteínas na biomassa residual de *Chlorella sp***

Foi realizada a análise de proteína da biomassa residual, a mesma apresentou um teor de proteínas de 12, 27 %. O fato de a biomassa apresentar uma quantidade de proteínas mais elevada do que a quantidade de lipídios está relacionada com a forma de cultivo dessa microalga. Onde é utilizada grande quantidade de nitrogênio, considerando que a mesma é cultivada para produzir biomassa para produção de produtos nutracêuticos. Considerando que biomassa residual de *Chlorella sp* apresentou uma boa quantidade de proteínas, ela *pode* ser destinada à fabricação de ração para animais considerando que apresenta uma boa quantidade de proteínas.

## 6. CONCLUSÃO

---

O catalisador a base de  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CaO}$  foi sintetizado, sendo que nas análises de caracterização foi verificado que a superfície da alumina foi modificada e que a mesma funcionou como suporte. Verificou-se ainda, que o catalisador foi eficiente e eficaz para reação de transesterificação de extratos lipídicos e da biomassa de *Chlorella sp in situ*.

Os resultados do planejamento fatorial mostraram que o aumento da quantidade de catalisador junto ao aumento do volume de metanol em relação a biomassa tende a maior produção de ésteres. Temperatura mais elevada, maior tempo, maior quantidade de catalisador e maior razão metanol/biomassa levaram a maior produção de ésteres na faixa de trabalho adotada. O teor de ésteres na reação de extrato lipídico foi maior do que na reação in situ, porém na transesterificação in situ são eliminadas várias etapas do processo o que reduz a quantidade de metanol utilizada no processo, o tempo e a temperatura.

O teor de lipídios extraídos da biomassa de *Chlorella* está de acordo com os dados disponíveis na literatura científica. No entanto, vale salientar que esses valores variam desde poucas unidades a dezenas. Isto está relacionado ao meio de cultivo da microalga.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução ANP nº 14, de 11.5.2012 - dou 18.5.2012.** Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml)>. Acesso em: 13 mai. 2016.
- AHMED, A. I.; EL-HAKAM, S. A.; KHDER, A. S.; EL-YAZEED, W. S. A. Nanostructure sulfated tin oxide as an efficient catalyst for the preparation of 7-hydroxy-4-methyl coumarin by Pechmann condensation reaction. **Journal of Molecular Catalysis a - Chemical**, v. 366, p. 99-108, 2013.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. California: Copyright, p. 83-100.2005.
- ALMEIDA NETO, J.A. de; NASCIMENTO, J. C. do; SAMPAIO, L. A. G.; CHIAPETTI, J.; GRANACHO, R. S.; SOUZA, C. N.; e ROCHA, V. A. **Projeto Biocombustível: processamento de óleos e gorduras vegetais in natura e residuais em combustíveis tipo diesel**. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Bahia, 2000.
- ARCEO, Á. A. **Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. 2012. 205 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- ARIOSTO HOLANDA. **Biodiesel e Inclusão Social**. Brasília, 2004.
- ARREGONDO-VEGA, B. O. **Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum***. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, **1995**.
- ATABANI, A. E.; SILITONGAA, A. S.; BADRUDDINA, I. A.; MAHLIAA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. 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, 2012.

BAUMANN, T. F.; GASH, A. E.; CHINN, S. C.; SAWVEL, A. M.; MAXWELL, R. S.; SATCHER, J.H. Synthesis of High-Surface-Area Alumina Aerogels without the Use of Alkoxide Precursors. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 2, p.395-401, 2005.

BASOVA, M. M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, v. 7, n. 1, p.33-57, 2005.

BECKER, E.W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge studies in biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press; 239pp, 1994.

BEN-AMOTZ, A. **Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products** - Major Industrial Species: *Dunaliella*. Handbook of Microalgal Culture, p.273-280, 2007.

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends In Food Science & Technology**, v. 15, n. 10, p.484-488, 2004.

BEHRENS, P. W.; KYLE, David J. MICROALGAE AS A SOURCE OF FATTY ACIDS. **Journal of Food Lipids**, v. 3, n. 4, p.259-272, 1996.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p.313-321, 1999.

CALERO, J.; LUNA, D.; SANCHO, E. D.; LUNA, C.; BAUTISTA, F. M.; ROMERO, A. A.; POSADILLO, A.; VERDUGO, C. Development of a new biodiesel that integrates glycerol, by using CaO as heterogeneous catalyst, in the partial methanolysis of sunflower oil. **Fuel**, v. 122, n. 0, p. 94-102, 2014.

CASTEL, B. **Les alumina set leurs applications**. Paris: Nathan, 74p, 1990.

CARRERO, Alicia et al. Synthesis of fatty acids methyl esters (FAMES) from *Nannochloropsis gaditana* microalga using heterogeneous acid catalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p.119-124, 2015.

CASTRO, R. H. R.; GOUVÊA, D. Efeito do íon Mn como aditivo na transição de fase da alumina. **Cerâmica**, v. 49, n. 309, p.55-60, 2003.



CENTRO DE TERAPIAS COMPLEMENTARES;  
<<http://www.centercomterapias.com.br/chlorella-kenbi>> Acesso em: 30 mai.2016.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p.1-14, 1999.

CESCUT, J., SEVERAC, E., JOUVE, C., URIBELARREA, J.; **Journal of Chromatography A**, 1218 373–379. 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p.294-306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p.126-131, 2008.

COBELAS, M. A.; LECHADO, J. Z. LIPIDS IN MICROALGAE-A REVIEW. 1. BIOCHEMISTRY. **Grasas y aceites**, v. 40, p. 118-145, 1989.

CHEN, L.; REN, S.; YE, X. P. Lactic acid production from glycerol using CaO as solid base catalyst. **Fuel Processing Technology**, v. 120, p.40-47, 2014.

DASGUPTA, C.N., GILBERT, J.J., LINDBLAD, P., HEIDORN, T., BORGVANG, S.A., SKJANES, K.; DAS, D. Recent trendson the developmentof photo biological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10218-10238, 2010.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Cienc. Rural**, v. 36, p.1959-1967, 2006.

DUARTE FILHO, A.; ANDRADE, E. B.; MENEZES, R. S. **Testes e ensaios para validação do uso da mistura biodiesel B5 em motores e veículos**. Brasília, Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia, 176 p.2009.

EPPLEY, R.W. The Growth and Culture of Diatoms: the biology of diatoms. Botanical Monographs. **Oxford: Blackwell Scientific**, v.13, p.64, 1977.

EZE, V.C.; HARVEY, A. P.; PHAN, A. N. Determination of the kinetics of biodiesel saponification in alcoholic hydroxide solutions. **Fuel**, v. 140, p.724-730, 2015.

FERREIRA, C.S.; PASSOS, R. R.; POCRIFKA, L. A. Synthesis and properties of ternary mixture of nickel/cobalt/tin oxides for supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 271, p.104-107, 2014.

FIGUEIREDO, J. L.; RIBEIRO, F. R. *Catálise Heterogénea*, Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa. 1989.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. D.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A. D.; MENEZES, R. S. Biodiesel from microalgae: progress and challenges. **Química Nova**, 36, 437-448, 2013.

GALADIMA, A.; MURAZA, O. Biodiesel production from algae by using heterogeneous catalysts: A critical review. **Energy**, v. 78, p.72-83, 2014.

GALVÁN-RUIZ, M.; HERNÁNDEZ, J.; BAÑOS, L.; NORIEGA-MONTES, J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. E. Characterization of calcium carbonate, calcium oxide, and calcium hydroxide as starting point to the improvement of lime for their use in construction. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 21, p.694-698, 2009.

GIRALDI, T. R.; ESCOTE, M. T.; MACIEL, A. P.; LONGO, E.; LEITE, E. R.; VARELA, J. A. Transport and sensors properties of nanostructured antimony-doped tin oxide films. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 4, p. 2678-2685, 2006.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1655-1661, 2012.

GOUVEIA, L., OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p.269-274, 2008.

GRIMA, E. M.; Belarbia, E. H.; Fernandedez, F.G A.; Medina, A. R.; Chisti, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p.491-515, 2003.

HALIM, R.; DANQUASH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.

HAKALIN, L. S. Otimização das condições de cultivo da Microalga *scenedesmus* sp. Para a produção de Biodiesel. 170f, Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.

HELLENBUST, J. A. Light: plants. In: KINNE, O. (Ed.). **Marine Ecology**. A Comprehensive, Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters, London: Wiley Interscience, p.124-158, 1970.

Holanda, A. Biodiesel e inclusão social, Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 200 p. 2004.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied energy**, v. 87, p.38-46, 2010.

HUANG, J.; XU, X.; GU, C.; WANG, W.; GENG, B.; SUN, Y.; LIU, J. Effective VOCs gas sensor based on porous SnO<sub>2</sub> microcubes prepared via spontaneous phase segregation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 173, p. 599-606, 2012.

HUANG, J.; WANG, L.; GU, C.; WANG, Z.; SUN, Y.; SHIM, J.-J. Preparation of porous SnO<sub>2</sub> microcubes and their enhanced gas-sensing property. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 782-790, 2015.

HERNANDEZ, M. T.; GONZALEZ, M. Synthesis of resins as alpha-alumina precursors by the Pechini method using microwave and infrared heating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 22, n. 16, p.2861-2868, 2002.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell mass and secondary products – major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: Richmond A. ed. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd.; pp. 264-272. Oxford, 2004.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARD, M.; POSEWITZ M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

KUMAR, A.; ERGAS S. YUAN X.; LANGENHOVE H. V. Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends In Biotechnology**, v. 28, n. 7, p.371-380, 2010.

LAM, M. K.; LEE, K.T. Mixed methanol–ethanol technology to produce greener biodiesel from waste cooking oil: A breakthrough for SO<sub>4</sub>–/SnO<sub>2</sub>–SiO<sub>2</sub> catalyst. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 8, p.1639-1645, 2011.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **J. Appl. Phycol.**, v. 21, n. 5, p.559-567, 2008.

LEE, H. V.; JUAN, J. C.; TAUFIQ-YAP, Y.H. Preparation and application of binary acid–base CaO–La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p.124-132, 2015.

LEŠNIK, L.; VAJDA, B.; ŽUNIČ, Z.; ŠKERGET, L.; KEGL, B. The influence of biodiesel fuel on injection characteristics, diesel engine performance, and emission formation. **Applied Energy**, v. 111, p.558-570, 2013.

LEMÕES, J. S. **Síntese de Ésteres Graxos de *Chlorella sp.* Utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação in situ.** 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; AMCMEEKIN, T. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 43, n. 2, p.107-116, 2000.

LIMA, J. R. DE O.; RONDENELLY SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; Santos, L. S.; José Ribeiro dos Santos Jr. J. R.; Moura, E. M. M.; Carla Verônica Rodarte de Moura, C.V.R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.600-603, 2007.

LUO, H.; FAN, W. Y.; LI, Y.; LUO, H. FAN, W. NAN, G. Z. Biodiesel production using alkaline ionic liquid and adopted as lubricity additive for low-sulfur diesel fuel. **Bioresource Technology**, v. 140, p.337-341, 2013.

MACIEL, A. P.; SCHREINER, W. H.; MANIETTE, Y.; LONGO, E.; LEITE, N. F. Microstructural and morphological analysis of pure and Ce-doped tin dioxide nanoparticles. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, n. 5, p. 707-713, 2003.

MACIEL, A. P.; LEITE, E. R.; LONGO, E.; VARELA, J. A. Método sol-gel modificado para obtenção de alumina nanoencapsulada com terras raras **Cerâmica**, v. 51, p.52-5, 2005.

MAHESH, S. E.; RAMANATHAN, A.; BEGUM, K. M. M. S.; NARAYANAN, A. Biodiesel production from waste cooking oil using KBr impregnated CaO as catalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 91, p. 442-450, 2015.

MANUALE, D. L.; GRECO, E.; CLEMENTZ, A.; TORRES, G. C.; VERA, C. R.; YORI, J. C. Biodiesel purification in one single stage using silica as adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, v. 256, p. 372-379, 2014.

MANSANO, E.; Extração (<http://emersonam.tripod.com/extracao.html>) ≥ acesso em: 27 mai.2016.

MENEZES, R. S. **Estudo do potencial de microalgas dulcícolas como matéria-prima para a cadeia de produção de biodiesel**. 2015. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Ambientais, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

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

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

MICHAEL, A.; BOROWITZKA, M. A. **Fats, oil and hydrocarbons**. Microalgal Biotechnology, Cambridge University Press, USA, p. 257-287, 1988.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Departamento de Combustíveis Renováveis. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. Brasília, dezembro 2014. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicações.html>. Acesso em 10 maio. 2016.

MIRGHIASI, Zahra et al. Preparation and characterization of CaO nanoparticles from Ca(OH)<sub>2</sub> by direct thermal decomposition method. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 1, p.113-117, jan. 2014.

MOUZINHO, A M C. **Produção de Biodiesel a partir do Óleo Vegetal de Babaçu (*Orbignya martiniana*) Empregando Catalisadores Heterogêneos Comerciais**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica,

Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2007.

MORETTO, E.; FETT, R. **Definição de óleos e Gorduras tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.**144p.São Paulo. Varela**1998.**

MOROS, J.; CASSELLA, R. J.; BARCIELA-ALONS, M. C.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; HERBELLO-HERMELO, P.; BERMEJO-BARRERA, P.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Estuarine sediment quality assessment by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 53, n. 2, p. 204-213, 2010.

MALEKZADEH M, ABEDINI NAJAFABADI H, HAKIM M, FEILIZADEH M, VOSSOUGH M, RASHTCHIAN D. Experimental study and thermodynamic modeling for determining the effect of non-polar solvent (hexane)/polar solvent (methanol) ratio and moisture content on the lipid extraction efficiency from *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**.V. 201, p.304-311, 2016.

MOTA, CLAUDIO J. A.; SILVA, CAROLINA X. A. DA; GONÇALVES, VALTER L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.639-648, 2009.

NATURAL MARKET COMÉRCIO DE PRODUTOS ORGÂNICOS LTDA; cultivo da Spirulina, texto enviado em janeiro de 2011. Disponível em:<<http://naturalmarket.lojaintegrada.com.br/>>acesso em 21 de junho de 2016 às 18: 27min.

NETO BENÍCIO, B.; SCARMINIO, S. I.; ROY E. B. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2001. 400p. Editora da Unicamp: Campinas, 2001.

OIKAWA, Takashi et al. A new heterogeneous olefin metathesis catalyst composed of rhenium oxide and mesoporous alumina. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 74, n. 1-3, p.93-103, 2004.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p.459-466, 2003.

OLIVEIRA, W. A. **Síntese e Caracterização de Alumina Modificada com Zinco e Cálcio Para o Uso Como Catalisadores Heterogêneos na Carbonatação de Glicerol.** 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2015.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J.; Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, p.957, 1995.

PARENTE, E. J. de S. **Biodiesel**: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Tecbio, 68p, 2003.

PECHINI, M. **Method of preparing lead and alkaline earth titanates and niobates and coating method using the same to form a capacitor US Pat.n. 3330697**, 1997.

PHUKAN, M.M. KATAK R. KONWAR B.K. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p.3307-3312, 2011.

PASCALGOETGHELUCKPHOTOGRAPHE; Micro- Algues, um NouvelorVert

<<http://www.goetgheluck.com/Micro-Algues,-Un-Nouvelor ert 31 15 RGP .html>

> acesso em 21 de junho de 2016.

PURGATO, F.I.s. et al. Activity of platinum–tin catalysts prepared by the Pechini–Adams method for the electro oxidation of ethanol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 628, n. 1-2, p.81-89, 2009.

RASOUL-AMINI, S.; MONTAZERI-NAJAFABADY N.; MOBASHER M.A.; HOSEINI-ALHASHEMI S.; GHASEMI Y.; *Chlorella sp.*: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photo bioreactor. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p.3354-3356, out. 2011.

REYERO, I.; ARZAMENDI, G.; GANDÍA, L. M. Heterogenization of the biodiesel synthesis catalysis: CaO and novel calcium compounds as transesterification catalysts. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1519-1530, 2014.

RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p. London: Wiley Interscience, p.124-158, 1970.

RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, p.264-272. 2004.

ROY, M. M.; WANG, W.; BUJOLD, J. Biodiesel production and comparison of emissions of a DI diesel engine fueled by biodiesel–diesel and canola oil–diesel blends at high idling operations. **Applied Energy**, v. 106, p. 198-208, 2013.

SANTOS, P. S.; SANTOS, H.S.; TOLEDO, S. P. **Standard transition aluminas: electron microscopy studies.** *Materials Research*, v. 3, n. 4, p. 104-114, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 20 de abril, 2016.

STOJKOVIĆ, I. J.; STAMENKOVIĆ, O. S.; POVRENOVIĆ, D. S.; VELJKOVIĆ, V. B. Purification technologies for crude biodiesel obtained by alkali-catalyzed transesterification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, n. 0, p. 1-15, 2014.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A.; JUNIOR, A. B. D. C.; ROHERS, F. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da ilha de Santa Catarina. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053-1058, 2010.

SILVA, G. S. **Extração do óleo de microalgas para produção de biodiesel.** 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SILVA, M. G. S. **Óxidos a base de estanho e cálcio preparados pelo método dos precursores poliméricos como catalisadores na reação de transesterificação.** 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2015.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioeng**; 101(2): p. 87-96, 2006.

TAUFIQ-YAP, Y. H.; TEO, S. H.; RASHID, U.; ISLAM, A.; HUSSIEN, M. Z.; LEE, K. T. Transesterification of *Jatropha curcas* crude oil to biodiesel on calcium lanthanum mixed oxide catalyst: Effect of stoichiometric composition. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1290–1296, 2014.

TAVARES, M. A. **Obtenção de catalisadores heterogêneos básicos para reação de transesterificação.** 83 f. Dissertação (Mestrado) Curso de Química Analítica, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2010.

TREDICI, M. R. **Mass production of microalgae: photobioreactors.** In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** Oxford: Blackwell Science, p.178-214, 2004.



TETTENHORST, Rodney; HOFMANN, Douglas A. Crystal chemistry of boehmite. **CLAYS CLAY MINER. Clays Clay Miner.** v. 28, n. 5, p. 373, 1980.

UMDU, EminSelahattin et al. Transesterification of Nannochloropsis oculata microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 11, p.2828-2831, 2009.

VANDAMME, D., PONTES, S. C. V., GOIRIS, K., FOUBERT, I., PINOY, L. J. J., & MUYLAERT, K. Evaluation of electro-coagulation–flocculation for harvesting marine and fresh water microalgae. **Biotechnology and bioengineering**, 108 n.10, p. 2320-2329.2011.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M.; Algal: An Introduction to Phycology. **Cambridge University Press**: Cambridge, 1995.

WATKINS R. S.; LEE A. F.; WILSON, K. Li-CaO, Catalysed tri glyceride transesterification for biodiesel applications. **Green Chemistry**, v. 6, n. 7, p. 335 – 340, 2004.

WESTBROOK, C.K.; PITZ, W. J.; SARATHY, S. M.; MEHL, M. Detailed Chemical Kinetic Modeling of the Effect of Double bonds on the Ignition of Biodiesel Fuels. **Proc. Combust. Inst.**, v. 34, p. 3014-3056, 2013.

WANG, R.; WU, Y.; HANG, H.; LIU, Y.; XIE, T.; ZHANG, K.; LI, H. *Orychophragmus violaceus* L., a marginal land-based plant for biodiesel feedstock: Heterogeneous catalysis, fuel properties, and potential. **Energy Conversion and Management**, v. 84, n. 0, p. 497-502, 2014.

WANG, R.; SUN, L.; XIE, X.; MA, L.; LIU, Z.; LIU, X.; JI, N.; XIE, G. Biodiesel production from *Stauntoniachinensis* seed oil (waste from food processing): Heterogeneous catalysis by modified calcite, biodiesel purification, and fuel properties. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 0, p. 8-13, 2014.

WU, H. T.; ZHANG, J. H.; WEI, Q.; ZHENG, J. L.; ZHANG, J. A. Transesterification of soybean oil to biodiesel using zeolite supported CaO as strong base catalysts. **Fuel Processing Technology**, v. 109, p. 13-18, 2013.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q.; J.; high quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Department of Biological Science and Biotechnology**, p.499, 2006.

ZHU, M., ZHOU, P.P., YU, L.J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresource Technology**, v. 84, p.93-95, 2002.