

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GUILHERME ARANTES PEDRO

Desenvolvimento de catalisador heterogêneo baseado em biocarvão
para a reação de transesterificação direta (*in situ*) da biomassa de
microalga

Lorena

2023

GUILHERME ARANTES PEDRO

Desenvolvimento de catalisador heterogêneo baseado em biocarvão para a reação de transesterificação direta (*in situ*) da biomassa de microalga

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de Desenvolvimento de Produtos e Processos.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

Versão Corrigida

Lorena
2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pedro, Guilherme Arantes
Desenvolvimento de catalisador heterogêneo
baseado em biocarvão para a reação de
transesterificação direta (in situ) da biomassa de
microalga / Guilherme Arantes Pedro; orientador
Messias Borges Silva - Versão Corrigida. - Lorena,
2023.
221 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2023

1. Transesterificação in situ. 2. Catalisador
heterogêneo. 3. Biocarvão. 4. Biodiesel. 5.
Microalgas. I. Título. II. Silva, Messias Borges,
orient.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Edna (*in memoriam*) e Élcio, a minha esposa Elis, a minha irmã Gabriela e meu cunhado Diego, por todo o tempo meu que deles fora privado, por todo apoio e compreensão pois sem vocês esse período teria sido ainda mais difícil sem vocês.

E a meu sobrinho, Matias, que veio ao mundo em 2022 para nos trazer mais alegria. Que este trabalho possa um dia trazer um mundo melhor para seu futuro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edna Arantes Pedro e Élcio Aparecido Pedro, pelo amor, apoio e suporte ao longo desses anos de graduação e pós-graduação.

À minha irmã, Gabriela Arantes Pedro, que sempre, de alguma maneira, se fez presente, me acalentou e incentivou, principalmente após a morte de nossa mãe. E a seu esposo, meu cunhado, Diego José Dias e seus pais, pela força e incentivo.

À minha esposa Elis Marina Sampaio Castro, a mais grata surpresa recebida em tempos da pandemia, pela paciência, carinho, companheirismo, amor e pleno apoio. E a sua família que carinhosamente me acolheram como parte família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Messias Borges Silva, novamente, pela confiança, ensinamentos, atenção e por acreditar neste trabalho.

À todos os professores da Escola de Engenharia de Lorena pelas sugestões, contribuições, aprendizados e análises que fizeram concretizar este trabalho.

À todos os colegas de pós-graduação, colegas de laboratório, aluno de IC's e estagiários pelo convívio, ajuda e momentos de descontração que tornaram esta jornada mais leve.

À secretária do PPGEQ, Ana Beatriz de Carvalho Lourenço, pela atenção e zelosa orientações a toda burocracia administrativas.

Ao Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da UFSCAR pelo acesso as cepas de microalgas e apoio técnico.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

PEDRO, G. A. **Desenvolvimento de catalisador heterogêneo baseado em biocarvão para a reação de transesterificação direta (in situ) da biomassa de microalga**. 2023. 221p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

Frente aos eventos climáticos extremos, por consequência do consumo sem precedentes de energia fósseis, a busca por fontes alternativas de energia tem impulsionado a pesquisa por matérias-primas renováveis para a produção de biocombustíveis. Dentre as novas alternativas, a biomassa de *Botryococcus braunii* e *Spirulina maxima* destacam-se como matéria-prima na geração de energia limpa. Neste aspecto, as pesquisas científicas com microalgas, muitas delas tem explorado o desenvolvimento de biodiesel por diferentes metodologias buscando viabilizar o processamento em biorefinarias. Assim, o presente trabalho desenvolveu um catalisador a base de biocarvão para catálise da transesterificação *in situ* da biomassa úmida de microalga para a produção sustentável de biodiesel dentro conceito de biorefinarias. Foram produzidos biocarvões com a biomassa residual do processo de extração de óleo de microalgas e, também, com a biomassa de *Spirulina máxima* (com e sem o pigmento ficocianina). i) Visando o aumento de porosidade do biocarvão, foram estudados por planejamento experimental de Taguchi (L9) os efeitos do ativador, concentração do ativador e temperatura na ativação química da biomassa de *S. maxima*. O KOH foi o ativador que maximizou a área superficial do biocarvão em $32,57 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. ii) Preliminarmente, o poder de catálise do biocarvão impregnado com heteropolíácido de molibdênio foi analisado na transesterificação do óleo de macaúba, óleo com perfil semelhante ao de microalgas, explorando os efeitos da concentração de impregnação e o seu percentual no meio reacional. O estudo, utilizando planejamento fatorial 2^2 central rotacional, indicou que: impregnação em baixa concentração (próximas a 2 mM) e o catalisador de biocarvão em percentuais acima de 40% (% m/m óleo) são mais eficazes na conversão. A melhor conversão do óleo de macaúba foi de 70,23%. iii) A exploração do catalisador de biocarvão na transesterificação *in situ* da biomassa úmida de *B. braunii* foi realizada por planejamento Box-Behnken analisando os efeitos do percentual do catalisador, volume de etanol e temperatura do reator. A máxima conversão em ésteres por transesterificação *in situ* atingiu 89,95%. A maximização do rendimento mássico e da conversão, dada pela otimização estatística, sugeriu percentual de catalisador de biocarvão em 10% (% m/m_{biomassa}), etanol $55 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ e temperatura em 189°C .

Palavras-chave: Transesterificação *in situ*. Catalisador heterogêneo. Biocarvão. Biodiesel. Microalgas. *Botryococcus braunii*. *Spirulina maxima*. Superfície de resposta.

ABSTRACT

PEDRO, G. A. **Development of biochar-based heterogeneous catalyst for the direct (in situ) transesterification reaction of microalgae biomass.** 2023. 221p. Thesis (Doctoral of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

Faced with extreme weather events, as a result of the unprecedented consumption of fossil energy, the search for alternative energy sources has driven the research for renewable feedstock for the biofuels production. The *Botryococcus braunii* and *Spirulina maxima* biomass stand out among the new alternatives as feedstock in the generation of clean energy. In this regard, among scientific research with microalgae, many of them have explored the development of biodiesel using different methodologies, seeking to make biorefineries processing feasible. Thus, the present work developed a biochar-based catalyst to catalyze the *in situ* transesterification reaction of wet microalgae biomass for the sustainable production of biodiesel within the concept of biorefineries. Biochars were produced with the residual biomass of the microalgae oil extraction process and also with the *Spirulina maxima* biomass (with and without the phycocyanin pigment). i) Aiming at increasing the porosity of the biochar the effects of activator, activator concentration and temperature on the chemical activation of *S. maxima* biomass were studied using the experimental design of Taguchi (L9). KOH was the activator that maximized the surface area of biochar in $32.57 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. ii) Preliminarily, the catalytic power of biochar impregnated with molybdenum heteropolyacid was analyzed in the transesterification of macaúba oil, an oil with a similar profile to that of microalgae oil, exploring the effects of impregnation concentration and its percentage in the reaction medium. The study, using a central rotational 2^2 factorial design, indicated that: low concentration impregnation (close to 2 mM) and the biochar catalyst in percentages above 40% (% m/m_{oil}) are more effective in the conversion. The best oil conversion of macaúba oil was 70.23%. iii) The exploration of the biochar catalyst in the *in situ* transesterification of the wet biomass of *B. braunii* was carried out by Box-Behnken design analyzing the effects of the catalyst percentage, ethanol volume and reactor temperature. The maximum conversion to esters by *in situ* transesterification reached 89.95%. Maximization of mass yield and conversion, given by statistical optimization, suggested percentage of biochar catalyst at 10% (% m/m_{biomass}), ethanol 55 mL/g_{biomass} and temperature at 189°C.

Keywords: *In situ* transesterification. Heterogeneous catalyst. Biochar. Biodiesel. Microalgae. *Botryococcus braunii*. *Spirulina maxima*. Response surface.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

%EE	Percentual de conversão em ésteres etílicos
ABS	Absorbância
AGL	Ácidos Graxos Livres
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo
<i>B braunii</i>	<i>Botryococcus braunii</i>
BBM	<i>Bold's Basal médium</i> (Meio de cultivo)
BC	Biocarvão
BC-HPA	Biocarvão impregnado com heteropoliácido
BC-HPA-Mo	Biocarvão impregnado com heteropoliácido de molibdênio
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BM-Extr.	Biomassa residual da extração de óleo
CA	Carvão ativado
CAC	Carvão Ativado Comercial
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
F	Teste F
FT-IR	<i>Fourier-Transform Infrared</i>
GL	Graus de liberdade
HC	Hidrocarvão
HPA	Heteropoliácido
HPA-Mo	Heteropoliácido de Molibdênio
HPA-W	Heteropoliácido de Tungstênio
LEM	Laboratório de Engenharia de Microalgas
MEV	Microscopia Eletrônico de Varredura
p	Valor-p
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>S. maxima</i>	<i>Spirulina maxima</i>
SMQ	Soma Média Quadrática

SQ	Soma Quadrática
t	Teste t
TE	Transesterificação
TEIS	Transesterificação In Situ
TG	Triglicerídeos
TGA	Análise de Termogravimetria
UFSCAR	Universidade Federal de São Carlos
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
WC	<i>Wright's Cryptophyte</i> (Meio de cultivo)

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	OBJETIVOS	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	<i>Microalgas</i>	26
3.1.1	Sistemas de cultivos em larga escala	27
3.1.2	<i>Botryococcus braunii</i>	28
3.1.3	<i>Spirulina maxima</i>	32
3.2	<i>Biorefinarias</i>	35
3.2.1	Lipídios e Biodiesel	40
3.2.2	Carboidratos e Bioetanol	45
3.2.3	Pigmentos	46
3.2.4	Biocarvão (BC)	47
3.3	<i>Conversão termoquímica</i>	48
3.3.1	Gaseificação	50
3.3.2	Pirólise	51
3.3.3	Torrefação	54
3.3.4	Carbonização hidrotermal	55
3.4	<i>Características do BC</i>	55
3.4.1	Propriedades físico-química do BC	56
3.4.2	Ativação de BCs	62
3.4.3	BC na remoção de Poluentes	67
3.4.4	BC como suporte catalítico	70
3.5	<i>Reação de transesterificação in situ (TEIS)</i>	72
3.6	<i>Catalisadores heterogêneos na reação de TEIS</i>	78
3.6.1	Catalisadores baseados em BC	84
4	MATERIAIS E MÉTODOS	90
4.1	<i>Cultivos das microalgas e cianobactérias</i>	90
4.2	<i>Acompanhamento do crescimento celular</i>	91
4.3	<i>Propagação e colheita de cultivo de B. braunii e S. maxima</i>	91
4.4	<i>Preparação do catalisador heterogêneo de BC de microalgas</i>	92
4.4.1	Pirólise da biomassa e purificação do BC	92
4.4.2	Impregnação do catalisador no BC por via úmida	92
4.4.3	Caracterização físico-química	93

4.5	<i>Ensaio de pré-tratamentos (ativação química em uma etapa) da biomassa de <i>S. maxima</i> para a produção de BC</i>	95
4.5.1	Delineamento do planejamento experimental	96
4.5.2	Adsorção de Azul de Metileno	97
4.6	<i>Ensaio de esterificação heterogênea de ácido palmítico – Seleção do suporte de BC</i>	97
4.7	<i>Ensaio de transesterificação (TE) heterogênea de óleo de macaúba</i>	98
4.7.1	Delineamento do estudo preliminar	99
4.8	<i>Ensaio de Transesterificação in situ (TEIS) heterogênea da biomassa úmida de <i>B. Braunii</i></i>	101
4.8.1	Delineamento da exploração	101
4.9	<i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)</i>	103
4.10	<i>Determinação de carboidratos (açúcares redutores) na biomassa residual</i> 105	
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	107
5.1	<i>BC de <i>S. maxima</i></i>	107
5.1.1	TGA da biomassa de <i>S. maxima</i>	107
5.1.2	Pirólise da biomassa de <i>S. maxima</i> e características físico-química do BC	108
5.2	<i>Pré-tratamento químico (ativação química em uma etapa) da biomassa de <i>S. maxima</i> para a produção de BC</i>	113
5.2.1	Análise estatística.....	116
5.3	<i>Preparo e seleção do catalisador heterogêneo de BC - Esterificação heterogênea de ácido palmítico</i>	121
5.3.1	Teste preliminar com BC de <i>S. maxima</i> impregnado	122
5.3.2	Teste preliminar com BC de <i>S. maxima</i> oxidado e impregnado....	125
5.3.3	Teste preliminar com BC de biomassa extraída (sem óleo) impregnado	129
5.3.4	Teste preliminar com carvão ativado comercial (CAC)	131
5.3.5	Teste preliminar com hidrocarvão (HC) impregnado.....	133
5.3.6	Teste preliminar com xerogel de carbono impregnado	133
5.3.7	Discussões gerais	134
5.4	<i>Transesterificação (TE) heterogênea do óleo de macaúba</i>	135
5.4.1	Análise estatística da conversão em ésteres etílicos	138
5.5	<i>Transesterificação In Situ (TEIS) heterogênea da biomassa úmida de <i>B. braunii</i></i>	142

5.5.1	Análise estatística do rendimento mássico.....	146
5.5.2	Análise estatística da conversão em ésteres etílicos	151
5.5.3	Discussões gerais.....	156
5.6	<i>Carboidratos biomassa residual da TEIS.....</i>	<i>157</i>
5.6.1	Análise estatística do percentual de carboidratos da biomassa residual	159
5.7	<i>Considerações Finais</i>	<i>164</i>
6	CONCLUSÕES	168
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	169
	REFERÊNCIAS	170
	APÊNDICE A - Propagação e colheita de cultivo de <i>B. braunii</i> e <i>S. maxima</i>	190
	APÊNDICE B – Espectros de RMN¹H do processo de TE heterogênea do óleo de macaúba utilizando o catalisador de BC.....	218
	APÊNDICE C – Espectros de RMN¹H do processo de TEIS heterogênea da biomassa úmida de <i>B. braunii</i> utilizando o catalisador de BC.....	220

1 CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Alternativas de produção de energia, como o biodiesel e bioetanol de biomassas, que não competem com a produção de alimentos e que reduza o consumo de água, são opções viáveis de bioenergia para o futuro. Neste cenário, o cultivo de microalgas e cianobactérias surge como uma alternativa para se produzir biocombustíveis sem interferir nas demandas globais de água e energia.

As microalgas e cianobactérias são seres microscópicos e crescem em meios aquáticos, como águas residuais, águas contaminadas e águas salobras, e que possuem, em condições específicas, a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios (óleo) que podem ser convertidos em biodiesel, ou acumular carboidratos (açúcares) que podem ser convertidos em bioetanol, ou ainda, produzir compostos de alto valor agregado como pigmentos e fármacos (dependendo da espécie). No entanto, a produção de biocombustíveis de microalgas ainda permanece em escala laboratorial devido a desafios de aumento de produtividade e otimização das etapas de downstream (colheita, secagem, extração e conversão das frações da microalga em biocombustíveis). Assim, a viabilidade e sustentabilidade de uma biorefinaria de microalgas parece depender do desenvolvimento bem-sucedido dos processos de downstream (COELHO *et al.*, 2019).

Neste contexto, o grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Microalgas (LEM) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL) vem estudando novas maneiras de melhorar o cultivo de microalgas e cianobactérias: fotobiorreatores diferenciados (AMARAL *et al.*, 2020a; BREDDA *et al.*, 2016), iluminação em diferentes comprimentos de onda (AMARAL *et al.*, 2016, 2020b), meio de cultivos modificados (AMARAL *et al.*, 2016; BREDDA *et al.*, 2016, 2019; LOURES, 2016; PEREIRA *et al.*, 2018a), e fitorremediação de efluentes (DOS SANTOS *et al.*, 2022; TAGLIAFERRO *et al.*, 2019). Além disso, novos métodos de extração de lipídios (BREDDA *et al.*, 2016; ZORN *et al.*, 2022a, 2017), produção de biodiesel (PEDRO *et al.*, 2021) e o pioneirismo na produção de biocarvão por esta pesquisa de doutorado. Além destes, outros compostos de elevado valor agregado como pigmentos, químicos de uso farmacêutico e cosméticos também podem ser obtidos.

Na produção de biodiesel de microalgas, embora a qualidade do biodiesel atenda as especificações exigidas por agências regulamentadoras (ANP no Brasil) para uso como biocombustível, o processo ainda apresenta elevado custo de produção. Entretanto, a produção do biodiesel de microalgas pode ser viabilizada por meio da simplificação das etapas de operações unitárias como, por exemplo, o processamento direto (*in situ*) da biomassa em reatores e uso de catalisadores heterogêneos.

Visando aprimorar a produção de biodiesel de microalgas, este trabalho buscou o desenvolvimento de um catalisador heterogêneo, baseado em biocarvão (BC) de cianobactéria e biomassa residual da extração de óleo, para o processo de reação de transesterificação *in situ* (TEIS) da biomassa de microalga. Tanto a biomassa para a produção de biodiesel quanto a biomassa para a produção de BC são oriundas de diferentes espécies (*Botryococcus braunii* e *Spirulina maxima*, respectivamente) tornando o processo de produção de biodiesel ainda mais sustentável.

A cianobactéria *S. maxima* tem por característica sintetizar ficocianina, um pigmento fotossintético, que possui alto valor agregado e aplicação comercial, e, portanto, a sua exploração é bem vista no conceito de biorefinarias. Porém, o desmembramento dos vários compostos, como a própria ficocianina, geraria como subproduto uma biomassa rica em proteína (de baixo valor agregado), que seria destinada a produção de ração animal. Entretanto, esta biomassa residual pode ser convertida em BC (de maior valor agregado) que possui maior aplicação comercial devido a sua alta capacidade de adsorção, assim, permitindo a sua exploração como suporte para um catalisador (catalisador heterogêneo). Em razão disto, a cianobactéria *S. maxima* foi utilizada como fonte de biomassa para a produção do BC neste trabalho. A preparação do catalisador pode ser feita pela ativação química do BC e por impregnação do catalisador (sais metálicos e heteropoliácidos) no BC.

A microalga *B. braunii*, por sua vez, foi usada como fonte de biomassa para a produção de biodiesel. A microalga do gênero *Botryococcus*, além de conter pigmentos como clorofilas a e b, e luteína (carotenoide), é considerada uma potencial fonte renovável e sustentável para aplicações industriais, devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de (exo-) polissacarídeos e lipídios, principalmente hidrocarbonetos (BLIFERNEZ-KLASSEN *et al.*, 2018) e, apesar

disso, são escassos os estudos referentes TEIS de catálise heterogênea utilizando a microalga *B. braunii*, bem como a TEIS dessa biomassa úmida.

Este trabalho apresenta com a proposta de desenvolver um catalisador sustentável a partir do BC de *S. maxima*, espécie que ainda é inexplorada na aplicação como suporte catalítico, além da existente lacuna na exploração da reação de TEIS heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver um catalisador heterogêneo a base de BC de cianobactéria (heteropoliácido suportando em BC) para aperfeiçoar a reação de TEIS da biomassa de microalga tendo em vista a produção sustentável de biodiesel dentro do conceito de biorefinarias.

2.2 Objetivos específicos

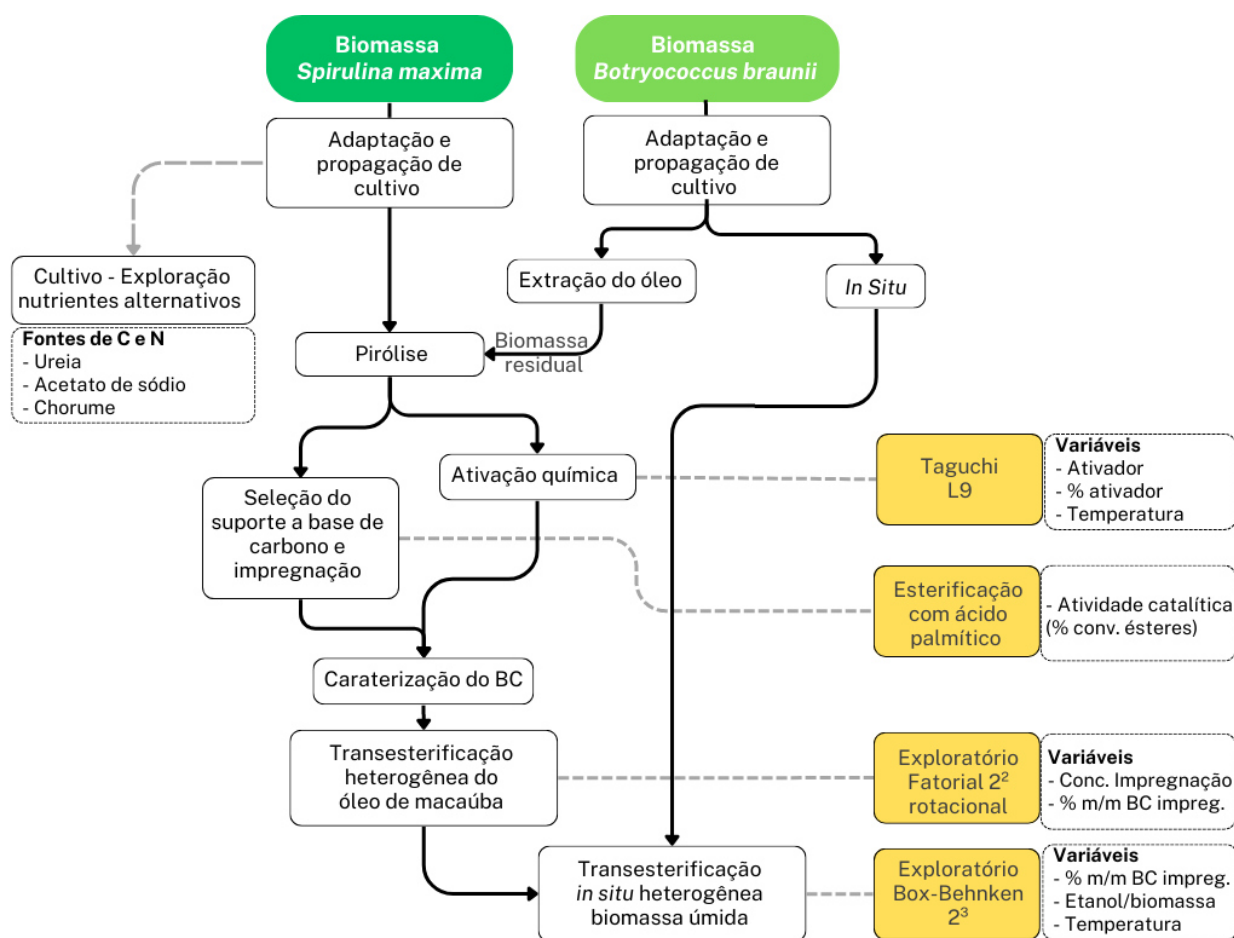
Os objetivos específicos seguiram as seguintes etapas:

- I. Produção da biomassa. As cepas de *B. braunii* e *S. maxima* foram adquiridas e propagadas em fotobiorreatores de maior volume como forma de produzir as biomassas utilizadas no projeto. Nesta etapa, foram realizados estudos paralelos no cultivo da *S. maxima* buscando a troca de fontes alternativas de nutrientes (ureia, acetato de sódio e chorume). Por não fazer parte do escopo original deste projeto, o estudo foi definido como APENDICE A.
- II. Pirólise, ativação, impregnação, caracterização e seleção do BC de *S. maxima*. Propondo a utilização do BC como suporte catalítico, a biomassa da cianobactéria *S. maxima* foi submetida ao processo de pirólise para a obtenção do BC. Nesta etapa, diferentes amostras do BC foram submetidas a oxidação por H₂O₂ e HNO₃ e impregnação por cloreto metálico e heteropoliácido (HPA). Delineando a melhora de porosidade do BC, tratativas de ativação por KOH, H₃PO₄ e ZnCl₂, foram estudadas a parte por planejamento L9 de Taguchi. As características morfológicas e estruturais dos catalisadores sintetizados foram determinadas.
- III. Analisar a adequação do uso do catalisador de BC na síntese de biodiesel. Os catalisadores de BC foram analisados por meio da esterificação do ácido palmítico. Nesta etapa do trabalho, foram estabelecidos a atividade catalítica dos catalisadores heterogêneos suportados (impregnados) em BCs. Posteriormente, foram explorados a concentração de impregnação do BC e o percentual do catalisador de BC através do estudo da reação de transesterificação (TE) do óleo de macaúba por planejamento fatorial composto central rotacional 2².
- IV. Explorar o processo *in situ* utilizando o catalisador heterogêneo proposto. Foram estudadas as condições que maximizasse a reação da TEIS heterogênea da

biomassa úmida de *B. braunii* em termos de conversão e rendimento em massa de ésteres. Foram realizados ensaios conforme o planejamento experimental de Box-Behnken e determinação da superfície de resposta.

A Figura 1 apresenta o fluxograma de trabalho com os objetivos específicos, informando o planejamento experimental utilizado e as variáveis estudadas em cada caso.

Figura 1 – Fluxograma das etapas de trabalho do desenvolvimento do catalisador de BC e planejamentos experimentais e variáveis estudadas.



Fonte: Próprio autor

Inicialmente, foram realizados os cultivos das espécies de microalgas e sua adaptação a propagação em fotobiorreatores de maior volume. A adaptação foi necessária pois algumas adversidades durante o crescimento foram encontradas. As considerações e estudos são apresentados no APENDICE A. Nesta etapa paralela do projeto, buscou-se fontes alternativas de nutrientes para o crescimento

da *S. maxima* que pudessem reduzir o custo de produção da sua biomassa bem como utilizar o choro como nutriente e mitigar o impacto causado pelo poluente.

Partiu-se então para a pirólise da biomassa de *S. maxima* e obtenção do BC. A seleção do suporte a base de carvão foi realizada juntamente com o estudo da ativação química, pois percebeu-se a necessidade de investigar melhorias na porosidade do BC. Assim, fez-se então o estudo da ativação química por três tipos de agentes ativadores utilizando a matriz experimental L9 de Taguchi com o objetivo de avaliar qual ativador, concentração do ativador e temperatura de pré-tratamento resultava em maior porosidade do BC. Já a seleção do suporte de BC foi realizada através de uma série de reações de esterificação do ácido palmítico a fim de avaliar a atividade catalítica do catalisador heterogêneo preparado com o BC. Nesta etapa foram testadas concentrações de impregnação do catalisador no BC, métodos de impregnação do catalisador e tratamento oxidativo dos BCs que trouxessem a maior conversão do ácido palmítico, um precursor do biodiesel facilmente quantificável por titulação ácido-base. Também foram testados outros carvões como controle.

Subsequentemente, com base nos resultados obtidos na seleção do suporte, o estudo preliminar da TE heterogênea com o óleo de macaúba utilizou o planejamento fatorial composto central rotacional 2^2 com repetições no ponto central com o objetivo de avaliar a concentração do catalisador no processo de impregnação do BC e o percentual do catalisador (BC impregnado) na reação de transesterificação do óleo de macaúba, um óleo semelhante ao de microalgas também conhecido pelo alto índice de acidez.

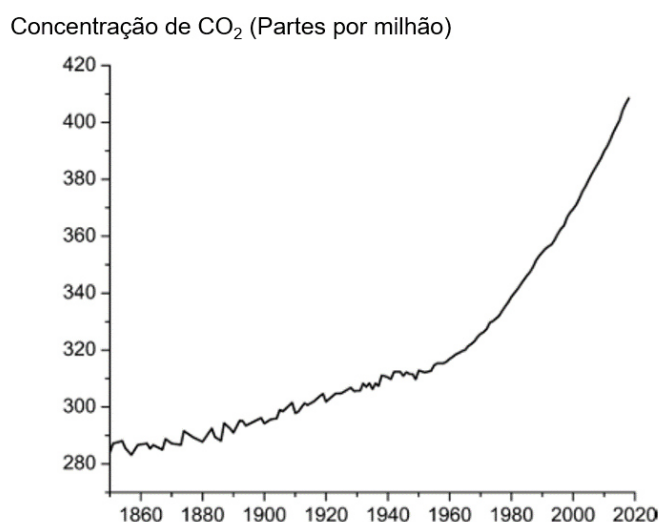
Com a interpretação necessária para a boa utilização do catalisador heterogêneo de BC, realizou-se um estudo de exploração no uso do catalisador heterogêneo proposto na TEIS da biomassa úmida da microalga *B. braunii*. Neste estudo de exploração foi utilizado o planejamento Box-Behnken 2^3 com o objetivo de determinar os melhores ajustes do percentual do catalisador de BC no meio reacional, da razão etanol/biomassa e da temperatura de trabalho do reator para o melhor rendimento em massa e óleo convertido.

De posse dos resultados, foi possível discutir os resultados e assim obter dados conclusivos do desenvolvimento do catalisador heterogêneo baseado em BC na reação de TEIS.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As alterações climáticas são atribuídas às emissões de gases de efeito estufa, sendo o CO₂ um dos principais gases responsáveis. E com a rápida e contínua industrialização, urbanização e automação; e modelo de desenvolvimento de “alto consumo de energia, alta poluição, e altas emissões”; levou a um aumento sem precedentes no consumo de energias fósseis e ao aumento da deterioração ambiental devido a poluição e emissão de gases de efeito estufa no planeta (DAI *et al.*, 2019; PATRA *et al.*, 2021). Devido ao consumo de energia orgânica não renovável (carvão e petróleo), a concentração de CO₂ na atmosfera (Figura 2), aumentou de 284ppm em 1850 para 409ppm em 2018, ou seja, um aumento de 44% em 138 anos (PATRA *et al.*, 2021).

Figura 2 - Concentração atmosférica global de CO₂ ao longo dos anos.



Fonte: traduzido de PATRA *et al.* (2021)

É indiscutível que as atividades humanas estão causando mudança climática, com eventos climáticos cada vez mais extremos, incluindo ondas de calor, chuvas fortes e secas mais frequentes e severas (UNFCCC, 2022). A mudança climática já afeta todas as regiões da terra, de várias maneiras, e as mudanças tendem a aumentar com o aquecimento, por isso a rápida, forte e sustentada redução em CO₂, metano e outros gases de efeito estufa são necessárias para limitar o aquecimento global (UNFCCC, 2022). Reconhecer que as atividades humanas tem papel nas mudanças climáticas do planeta é questão

prioritária para que busquemos por fontes de energia alternativas sustentáveis como forma da redução da emissão de carbono.

A produção de energia renovável se tornou uma via de pesquisa inevitável entre os países para atender a demanda de energia e simultaneamente reduzir a emissão de gases de efeito estufa a partir da queima de combustíveis fósseis convencionais (SEKAR *et al.*, 2021).

Atualmente, as principais e mais difundidas fontes alternativas de energia renováveis são fontes de energia inorgânica, como eólica, solar e hidroeletricidade, e fontes de energia orgânica, como os biocombustíveis. Aravind *et al.* (2020) aponta que, apesar de serem energias renováveis e de terem potencial para suprir as demandas energéticas mundiais, as fontes de energia inorgânicas tem grandes desvantagens ou impactos ambientais e sociais como demonstrado no Quadro 1.

Altos custos de construção e manutenção, sazonalidade e distribuição desigual das fontes, impactos sociais e ambientais são apontados como principais contras na produção de energia renovável inorgânica (Quadro 1).

Por outro lado, a energia orgânica renovável (bioenergia) refere-se a energia obtida de organismos vivos como a biomassa, matéria-prima orgânica derivada de material vegetal, direta ou indiretamente, resultante da fotossíntese (ARAVIND *et al.*, 2020). As biomassas comumente usadas para produção de energia incluem uma grande variedade de resíduos orgânicos, resíduos agrícolas, resíduos alimentares, resíduos sólidos urbanos, lodos de esgoto, esterco de gado, resíduos verdes municipais (biomassa lignocelulósica) e culturas com finalidade energética (ARAVIND *et al.*, 2020; PATRA *et al.*, 2021).

O processamento químico, bioquímico ou termoquímico da biomassa resulta em uma variedade de biocombustíveis para geração de bioenergia, como bioetanol, biobutanol, biodiesel, biogás, biohidrogênio, biocarvão, bio-óleo e gás de síntese (SEKAR *et al.*, 2021). Dentre os biocombustíveis citados, o biodiesel é apontado como a solução mais promissora de energia renovável de longo prazo devido à sua compatibilidade de mistura com o diesel; logo, sua utilização requer apenas pequenos ajustes no motor, e à sua produção que requer processos com pouco impacto ambiental (NGUYEN *et al.*, 2021; OREGÉ *et al.*, 2022).

Quadro 1 - Fontes de energia inorgânica renovável e suas principais desvantagens.

Fontes de energia inorgânica renováveis	Desvantagens
Energia Solar	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo de instalação; - Elevado custo de fabricação por usar metais raros (telúrio, prata e índio); - Manutenção constante; - Não uniformidade de distribuição de radiação solar em algumas áreas da Terra
Energia Eólica	<ul style="list-style-type: none"> - Não confiável devido a distribuição desigual e sazonal dos ventos
Hidroeletricidade	<p>Na construção das barragens:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Perturba o equilíbrio ecológico local; - Erosão do solo; - Inundação de vales; - Deslocamento em massa de pessoas locais causando problemas sociais

Fonte: (ARAVIND *et al.*, 2020).

Apesar de haver debate sobre matéria-prima, sustentabilidade e lucratividade, há um consenso de que os biocombustíveis podem reduzir as emissões de gases de efeito estufa e trazer benefícios socioeconômicos (ARAVIND *et al.*, 2020). Em especial, as microalgas surgem como potencial candidata a matéria-prima na geração de energia limpa, sustentável, de acesso universal e capaz de aumentar a matriz energética global, conforme definido pelo 7º Objetivo de Desenvolvimento Sustentável da ONU (ONU, 2023). Em 2020, as microalgas contribuíram com 6,8% da energia mundial como uma fonte de energia promissora para produção de biocombustíveis (RUSSELL; RODRIGUEZ; YASEEN, 2022).

As microalgas são microrganismos fotossintéticos unicelulares ou multicelulares que requerem apenas luz, água, CO₂ e nutrientes suficientes para o crescimento que são acessíveis em meio de cultura ou águas residuais, logo, seus habitats estão confinados a um ambiente aquático, e suas funções ecológicas são de grande importância, pois são um dos principais produtores de oxigênio atmosférico (equivalem a 40% do O₂ de nosso ecossistema) (KIM *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2022)

As microalgas tem crescimento rápido e um curto ciclo de vida (por alguns dias) o que resulta em alta taxa de produção de biomassa e que contém principalmente carboidratos, proteínas, gorduras, cinzas, água e, particularmente, pouca ou nenhuma lignina (LAW *et al.*, 2022). Além disso, as microalgas diferem das plantas superiores por não terem folhas, caules ou raízes (LEE; KWON; PARK, 2019). O baixo teor de lignina é uma vantagem sob as biomassas lignocelulósicas, pois o pré-tratamento requerido para as microalgas é simplificado em comparação com as biomassas lignocelulósicas com alto teor de lignina e estrutura fibrosa. (LAW *et al.*, 2022).

O alto teor de lipídios e a excelente capacidade de fixação de CO₂ das microalgas por fotossíntese tornaram o biodiesel procedente dos lipídios de microalgas um promissor combustível neutro em carbono (KIM *et al.*, 2022). Além disso, o CO₂ atmosférico pode ser usado como fonte de carbono na produção de alta concentração de biomassa com alto teor de lipídios (ZORN *et al.*, 2020), onde cerca de 1,83 kg de CO₂ é convertido em 1 kg de biomassa seca de microalgas em condições ideais (KARPAGAM; JAWAHARRAJ; GNANAM, 2021).

As microalgas podem ser empregadas para fixar CO₂ existente em gases de combustão de usinas de energia ou outras fontes de emissão (KARPAGAM; JAWAHARRAJ; GNANAM, 2021). Os cultivos de microalgas como biorremediação de poluentes também merece destaque, Nie *et al.* (2020) relatam que as microalgas utilizam mecanismos de biodegradação, bioadsorção e bioacumulação para remover pesticidas, resultando no duplo benefício de tratamento de águas residuais e produção de bioprodutos a partir da biomassa.

As microalgas têm sido vistas como matéria-prima para produção de biocombustíveis de terceira geração, o que significa que são usadas para melhorar o desempenho de biocombustíveis processados a partir de matéria-prima existente (ARAVIND *et al.*, 2020). No entanto, Kim *et al.* (2022) afirmam que a comercialização do biodiesel de microalgas ainda não é realizada devido ao processo de cultivo, pré-tratamento da biomassa e conversão serem caros e intensivos no uso de energia quando comparados a produção de biodiesel de 1^a geração. Segundo o autor, o desenvolvimento de biodiesel de microalgas surgiu nas últimas duas décadas, mas os estudos tem focado principalmente na conversão de lipídios usando processos já estabelecidos na produção de biodiesel de 1^a geração. Portanto, a produção de biodiesel de microalgas deve ter processos

independentes dos já estabelecidos e desenvolvimento de tecnologias e processamentos próprios. Ainda assim, com base nos padrões de qualidade brasileiros, norte-americanos e europeus, o biodiesel de microalgas é promissor em relação ao biodiesel de óleo de soja (ZORN *et al.*, 2020).

Segundo Dassey *et al.* (2014) os maiores custos são atribuídos aos nutrientes, colheita da biomassa e extração de lipídios, assim, pequenas melhorias de energia nesses processos podem resultar em balanço energético positivo e melhorar esse cenário, como desenvolvimento tecnológico em melhoria de cultivo e agregação de valor à biomassa. Desenvolvimentos, como a utilização de consórcios (líquens) de microalgas com espécies fúngicas realizadas por Zorn *et al.* (2022a), podem melhorar o balanço energético da aplicação industrial. Como aponta os autores, as estruturas de líquen produzida são facilmente recuperadas, que representa colheita de baixo custo, fornece biomassa oleaginosa com alta concentração de lipídios, além de ser uma alternativa eficiente de biorremediação.

Os recentes avanços na produção de biodiesel estão sendo direcionados à valorização dos subprodutos para custear o custo de produção associado, isso inclui transformar a biomassa residual e o glicerol em produtos alternativos (OREGE *et al.*, 2022). Dassey *et al.*, (2014) dissertam que, considerando um cenário conservador de produtividade contínua de microalgas de $15\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ com concentração de lipídios de 20%, nas atuais condições tecnológicas de produção de biodiesel, estima-se que a energia consumida na produção do biodiesel supera em 374% da energia extraída do próprio biodiesel, ou seja, um balanço de energia negativo. No entanto, os próprios autores afirmam que pequenos aumentos nas produtividades de biomassa ($17\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$) e teor de lipídios (25%) são suficientes para tornar o balanço energético mais favorável e que, também, esse desequilíbrio energético pode ser superado com a incorporação de processos de valor agregado (como as biorefinarias). Segundo os autores, a simples produção da biomassa a partir de águas residuais (tratamento de efluentes) e produção de biogás por digestão anaeróbica da biomassa residual (pós extração do óleo) permite um excedente energético de 13,2%.

Além dos lipídios, as microalgas contêm carboidratos, proteínas e outros compostos orgânicos produzidos metabolicamente. Para transformar os resíduos sólidos em produtos de valor agregado, processos biológicos/químicos já estabelecidos para conversão de biomassa também podem ser usados, como

fermentação, pirólise, gaseificação, liquefação hidrotermal, combustão e digestão anaeróbica e outros processos biológicos/químicos (KIM *et al.*, 2022; OREGÉ *et al.*, 2022). Portanto, converter todas as frações orgânicas de microalgas em produtos de valor agregado é de grande importância para tornar as microalgas uma matéria-prima mais promissora para biorefinarias (KIM *et al.*, 2022) e assim promover a economia circular para o processamento de biodiesel e sustentabilidade do processo (OREGÉ *et al.*, 2022).

Portanto, apesar do grande potencial de aplicação, a industrialização da cultura e valorização de microalgas ainda tem desafios remanescentes na escala de cultivo, colheita e extração de moléculas alvo (LAW *et al.*, 2022). Para Nitsos *et al.* (2020), embora um número significativo de pesquisas sobre a valorização de microalgas tenham sido feitas, não podem ser consideradas exaustivas. Os autores ainda completam que o grande número de espécies de microalgas disponíveis (e ainda inexploradas) combinado com a diversidade de métodos de processamento pós-colheita requer esforço ainda maior de pesquisa e otimização. Portanto, existem diversas oportunidades de pesquisas e exploração da economia circular para o aproveitamento total da biomassa através do conceito de biorefinaria (alta gama de bioprodutos produzidos) e do ganho com a biorremediação e tratamento de poluentes.

3.1 Microalgas

As microalgas (fitoplâncton) são um conjunto diversificado de organismos fotossintéticos predominantemente aquáticos, unicelulares, multicelulares ou formas coloniais, encontrado na atmosfera, no topo de montanhas ou a 200-300m abaixo do oceano (LEVINE, 2018). As microalgas são evolutivamente diversas, ocupando os domínios de eucariotos e bactérias, incluindo Cianobactérias (algas verdes-azuladas), Charophyta (chara), Chlorophyta (verde), Rhodophyta (vermelha), Ochrophyta (marrom), Glaucophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Bacillariophyceae (diatomáceas) e Dinophyceae (dinoflagelados); e ao longo da evolução ocuparam uma variedade nichos ecológicos: planctônicos (crescem na água), bentônico (cresce na areia, terra, solo), epífito (cresce em outras algas, ervas marinhas e árvores), simbiose com fungos e invertebrados, e parasitas em casos raros (LEVINE, 2018).

Microalgas são encontradas em todo o mundo (TOMASELLI, 2004). Apesar do número total de microalgas descritas, cerca de 4100 espécies, é provável que apenas algumas centenas de espécies tenham sido exaustivamente investigadas, das quais apenas algumas dezenas estão totalmente compreendidas com seu potencial nutricional, sanitário, patogênico ou comercial (LEVINE, 2018).

3.1.1 Sistemas de cultivos em larga escala

Com base nas diferentes rotas metabólicas, as microalgas podem ser cultivadas em sistemas: i) Fotoautotrófico, uso da luz (fotossíntese) e CO₂ como fonte de energia e fonte de carbono, respectivamente; ii) Heterotrófico, uso de substratos orgânicos como fonte de energia e carbono; e iii) Mixotrófico, uso da luz como principal fonte de energia mas os compostos orgânicos e CO₂ são também são essenciais (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017).

Em geral, a produção de biomassa em larga escala envolve o cultivo em sistemas de meio aquático. Esses sistemas de cultivo podem ser: i) natural, corpos de água naturais que incluem tanques, lagoas e lagos; e ii) artificiais, principalmente fotobiorreatores de diferentes formas (placa, tubular ou coluna) (ADENIYI; AZIMOV; BURLUKA, 2018). Ainda, as microalgas podem ser cultivadas tanto em sistemas abertos quanto sistemas fechados (Figura 3). O sistema aberto se refere ao tanque aberto exposto ao meio ambiente e configurados de várias maneiras como raceway (Figura 3 a) e lagoas abertas circulares (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017). Por outro lado, os sistemas fechados são chamados fotobiorreatores e, também, configurado de diversas maneiras como fotobiorreatores tubulares (Figura 3 d), colunares (de bolhas ou airlift, Figura 3 c), placas planas (Figura 3 d) e membrana (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017).

Ambos sistemas, abertos ou fechados, apresentam vantagens e desvantagens. Sistemas abertos como as raceways geralmente requerem menor investimento inicial e são de fácil operação, no entanto, são mais suscetíveis a contaminações e evaporação da água (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017). Os sistemas fechados tem custos adicionais com iluminação e alimentação de CO₂ (ou bombeamento de ar atmosférico), porém são mais fáceis de controlar e menor ocorrência de contaminações (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017). O fotobiorreator

ideal irá depender de fatores como iluminação e espaço disponível, carga de trabalho e altura do fotobiorreator, por exemplo.

Figura 3 - Principais fotobiorreatores para cultivo de microalgas em larga escala: (a) raceway, (b) placas planas, (c) coluna de bolhas e (d) tubular.



Fonte: BITOG et al. (2011)

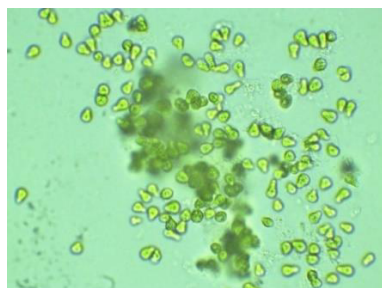
O meio de cultivo fotossintético em larga escala requer luz, água (entre 20°C a 30°C), CO₂, e elementos inorgânicos essenciais como nitrogênio (N), fósforo (P), ferro e silício em alguns casos (CHISTI, 2007). Conforme a sua origem, cada espécie tem necessidades diferentes destes nutrientes essenciais. Neste trabalho foram utilizadas duas espécies diferentes e suas características, bem como o meio de cultivo, são abordados no item 3.1.2 e 3.1.3.

3.1.2 *Botryococcus braunii*

A microalga *B. braunii* (Figura 4) é uma microalga planctônica, unicelular, verde (Chlorophyta), colonial e, exclusivamente entre as microalgas, a *B. braunii* sintetiza e secreta grandes quantidades de hidrocarbonetos de cadeia longa (C20 - C40) que podem ser tratados posteriormente para gerar gasolina, diesel e combustível de aviação ou óleo de lubrificação (COOK *et al.*, 2017). Por esta razão,

este gênero de microalga tem atraído interesse como potencial fonte de biocombustíveis.

Figura 4 - Microfotografia de células da microalga *B. braunii* (ampliação de 10x).



Fonte: Próprio autor

Esta microalga que tem chamado a atenção devido a sua capacidade de acumular grandes teores de lipídios (de 25% a 75% de sua massa seca), como pode ser comparado com algumas microalgas na Tabela 1, onde as microalgas que mais se aproximam em termos de produção lipídica são as espécies *Nannochloropsis sp.* e *Schizochytrium sp.* Além disto, a sua biomassa pode conter vários tipos de hidrocarbonetos, ácidos graxos, triacilgliceróis, esteróis e pigmentos como carotenoides e clorofilas (BLIFERNEZ-KLASSEN *et al.*, 2018; ISHIMATSU *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Percentual de óleo em algumas espécies de microalgas.

Microalga	Teor de óleo (% massa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Fonte: Traduzido de Chisti (2007)

Cepas selvagens de *B. Braunii* diferem no tipo de hidrocarbonetos que sintetizam e acumulam. Segundo Ishimatsu *et al.* (2012) e Metzger *et al.* (2005),

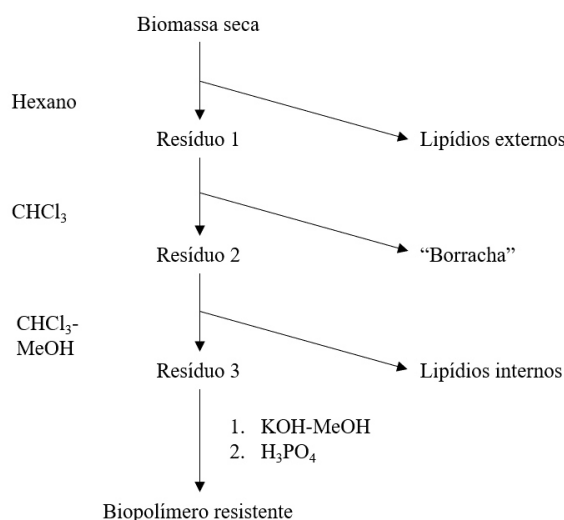
essa microalga é subclassificada em três raças químicas (A, B e L) de acordo com as estruturas de hidrocarbonetos produzidos: (A) n-alcadienos e/ou trienos com número ímpar de carbono e seus derivados são sintetizados pela raça A, (B) triterpenos específicos de C_nH_{2n-10} ($n=30-37$), chamados botryococenes, triterpenóides e esqualenos metilados que são sintetizados pela raça B, (L) e tetraterpeno chamado licopadieno que é sintetizado pela raça L.

A microalga *B. braunii* tem uma característica notável de desenvolver "florações" na superfície de águas agitadas, que consiste em uma massa flutuante de colônias ricas em óleo (METZGER; LARGEAU; CASADEVALL, 1991). Essas colônias aparecem como aglomerados de células com tamanho aproximado de 1mm, e os vários grupos podem ser anexados um ao outro (BLACKBURN, 1936). Em específico, as células possuem formato piriforme (formato de pera) de tamanho de $13 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$ e são embebidas em uma matriz impregnada por um óleo excretados das células (METZGER; LARGEAU; CASADEVALL, 1991). Ainda, nas células envelhecidas, os cloroplastos exibem grão de amido, uma característica típica de clorofíceas, e o citoplasma é invadido por inclusões lipídicas. A microalga *B. braunii*, também, sintetiza polissacarídeos extracelulares formando um invólucro em torno de suas colônias, o que limita a extração de hidrocarbonetos dessa microalga (TSUTSUMI *et al.*, 2018). Assim, a maior parte dos lipídios estão localizados nas paredes externa que circundam a parte basal das células e constroem a matriz das colônias (METZGER; LARGEAU; CASADEVALL, 1991).

Esses lipídios externos podem ser facilmente extraídos a partir da biomassa seca com hexano e o óleo apresenta uma cor amarelo a vermelho, as vezes acastanhado, como pode ser visto no esquema da Figura 5 adaptada de Metzger *et al.*(1991). No entanto a recuperação dos lipídios nas membranas e inclusões citoplasmáticas exige uma extração mais longa com clorofórmio e metanol. Segundo Metzger *et al.* (1991), uma extração adicional por clorofórmio realizada entre os tratamentos com hexano e $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$, fornece um material emborrachado (Figura 5).

Como visto, a biomassa de *B. braunii* tem um grande potencial para a produção de vários produtos de interesse comercial (óleos e pigmentos), bem como utilização dos subprodutos advindos do processamento da biomassa (carboidratos proteínas). Por sintetizar grandes quantidades de lipídios, o cultivo comercial de *B. braunii* à torna uma microalga de interesse para a produção de biodiesel microalgal.

Figura 5 - Procedimento de isolamento de lipídios e lipídios macromoleculares de *B. braunii*.



Fonte: Traduzido de Metzger; Largeau; Casadevall (1991)

3.1.2.1 Meio de cultivo da *B. braunii*

A microalga *B. braunii* é uma espécie encontrada em todos continentes de zonas temperadas e tropicais habitando lagos de água doce, salobra e salina, reservatórios e poças (METZGER; LARGEAU; CASADEVALL, 1991). Em geral, o meio de cultivo para as microalgas de água doce verde-amarelas é o meio desenvolvido por Guillard e Lorenzen (1972), denominado meio Wright's Cryptophyte (WC) com pH neutro. A composição do meio WC é apresentada na Tabela 2.

O meio de cultivo WC apresenta nutrientes essenciais ao crescimento celular desta espécie de microalga e são divididos entre macro e micronutrientes. Os micronutrientes, como os íons metais em quantidades de traços e vitaminas, participam das atividades enzimáticas da célula, enquanto os macronutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo e potássio, por exemplo, apresentam funções como a de constituir a estrutura de biomoléculas, membranas e meio intracelular (LOURENÇO, 2006).

Em comparação com o meio BBM (Bold's Basal medium), meio de cultivo para microalgas de água doce verdes (clorofitas), no meio WC a concentração de

nitrogênio é três vezes menor e a concentração de fósforo é trinta e quatro vezes menor (MENEZES *et al.*, 2016). Esta diferença entre os meios de cultivos tem efeitos sob a produtividade de biomassa, concentração em clorofila e carotenoides da biomassa cultivada. Menezes *et al.* (2016) estudou a influência destes dois meios de cultivo na produção de biomassa, ácidos graxos e a composição dos pigmentos para a microalga *Choricystis minor*. Segundo o autor, o meio BBM forneceu maior produtividade em células e cerca de duas vezes mais a concentração de carotenoides e clorofila, porém o meio WC permitiu um rendimento maior em ésteres metílico (biodiesel metílico) com ésteres de ácidos graxos similares ao gerados por óleo de soja.

Tabela 2 - Composição padrão do meio de cultivo WC.

	Composto	mg.L⁻¹
Macronutrientes	CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76
	MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97
	NaHCO ₃	12,6
	K ₂ HPO ₄	8,71
	NaNO ₃	85,01
	NaSiO ₃ .9 H ₂ O	28,42
Micronutrientes	Na EDTA	4,36
	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,006
	H ₃ BO ₃	1,0
Vitaminas	Tiamina (B1)	0,1
	Biotina (B7)	0,05
	Cianocobalamina (B12)	0,05

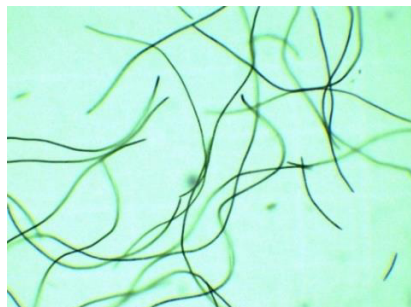
Fonte: Guillard e Lorenzen (1972)

3.1.3 *Spirulina maxima*

A *S. maxima* (Figura 6) faz parte de um grupo de cianobactérias verdes-azuladas multicelulares (tricomas) e filamentosas que ganharam popularidade como complemento alimentar por seu alto conteúdo de macro e micro nutrientes como proteínas e vitaminas (KUMAR; MOHANTY; YASHASWINI, 2018; USHARANI; SARANRAJ; KANCHANA, 2012). As cianobactérias do gênero *Spirulina* são uma das biomassas alimentares mais vendidas atualmente, por

serem uma das primeiras algas produzidas em larga escala de maneira economicamente viável (BHALAMURUGAN; VALERIE; MARK, 2018; SOUZA *et al.*, 2015).

Figura 6 - Microfotografia de células da cianobactéria *S. maxima* (ampliação de 10x).



Fonte: Próprio autor

Embora essa cianobactéria tenha por característica conter baixas quantidades de lipídios, a biomassa de *S. maxima* possui um grande percentual de proteínas (60% a 70%), fator de interesse para o processo de pirólise da biomassa (SIMÃO *et al.*, 2018). Por pirólise, a biomassa desta cianobactéria resulta em biocarvão (BC) de propriedades semelhante ao da biomassa lignocelulósica, porém requer temperatura de pirólise mais branda, cerca de 350°C comparados aos 900°C para a biomassa lignocelulósica (CHAIWONG *et al.*, 2012). Por ter um cultivo já consolidado e pelo BC equivalente ao BC lignocelulósico, este gênero cianobactéria torna-se uma candidata viável à produção de BC.

Além do potencial de produção de BC, a biomassa de *S. maxima* é uma notável fonte natural de corantes alimentícios como clorofila, carotenoide e ficocianina, que são compostos responsáveis pela captação de luz no ciclo da fotossíntese (SILVEIRA *et al.*, 2007; TAVANANDI; RAGHAVARAO, 2019). Além da aplicação alimentícia da biomassa, a ficocianina, uma ficobiliproteína (proteína fotossintética) de cor azulada responsável por captar cerca de 50% da luz em algas verde azuladas, tem aplicações farmacêuticas e cosméticas pois apresenta propriedades neuroprotetora, hepatoprotetora, anti-inflamatória e antioxidante (TAVANANDI *et al.*, 2018).

Como visto, a biomassa de cianobactérias também possui um grande potencial para a produção de uma ampla gama de produtos, bem como utilização dos subprodutos advindos do processamento da biomassa. Por sintetizar tais

pigmentos de alto valor de mercado, e do BC com propriedades semelhantes ao BC lignocelulósico, a otimização das condições de cultivos maximiza a produção destes bioprodutos, reduzindo o custo de produção da biomassa de *S. maxima*.

3.1.3.1 Meio de cultivo da *S. maxima*

As espécies de *Spirulinas* são naturalmente encontradas em regiões tropicais habitando lagos alcalinos (pH 8 -11) com alta concentração de NaCl e íons carbonato e bicarbonatos (KARSSA; PAPINI; KASAN, 2018; USHARANI; SARANRAJ; KANCHANA, 2012). Desta maneira, o cultivo de *Spirulina* requer um suprimento contínuo de íons bicarbonato em meio de alta alcalinidade. Atualmente, o meio de cultivo desenvolvido por Claude Zarrowk (ZARROUK, 1966) é o mais utilizado na produção de *Spirulina*. A composição do meio *Zarrowk* é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição padrão do meio *Zarrowk*

	Composto	g.L⁻¹
Macronutrientes	NaHCO ₃	16,8
	K ₂ HPO ₄	0,5
	NaNO ₃	2,5
	K ₂ SO ₄	1,0
	NaCl	1,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
	EDTA	0,08
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	2,85
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
	MoO ₃	0,015
	NH ₄ VO ₃	0,0023
	K ₂ Cr(SO ₄) ₄ .24H ₂ O	0,0096
	NiSO ₄	0,00478
	NaWO ₄ .2H ₂ O	0,00179
	Ti ₂ (SO ₄) ₃	0,004
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0044	
Vitaminas (mg.L ⁻¹)	Tiamina (B1)	0,1
	Biotina (B7)	0,05
	Cianocobalamina (B12)	0,05

Fonte: Zarrowk (1966)

O meio de cultivo desenvolvido por Zarrouk (1966) apresenta nutrientes essenciais ao crescimento celular e, também, são divididos entre macro e micronutrientes que participam das atividades enzimáticas e estruturais das células. A produção de *Spirulina* requer um meio com alta carga de macronutrientes quando comparados com os meios para cultivos de *Chlorella* e *Scenedesmus* (meio BBM e WC, respectivamente), ou comparada com a *Botryococcus* apresentada neste trabalho.

Nesse contexto, pesquisadores vêm dedicando intensa pesquisa buscando fontes alternativas destes macronutrientes como forma de diminuir o custo de produção de *Spirulina*. Sassano *et al.* (2007) avaliaram o uso de cloreto de amônio (NH_4Cl) como fonte alternativa de nitrogênio em cultivo contínuo de *S. platensis* e alcançaram maior produtividade de células ($92.4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) em comparação às produtividades obtidas em cultivos com nitratos ou ureia. Por sua vez, Matsudo *et al.* (2008), utilizando ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) como fonte alternativa de nitrogênio, aumentaram a produtividade em células de *S. platensis* com rendimento de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$ em uma produção de larga escala. Dos Santos *et al.* (2016) demonstraram que a vinhaça de cana de açúcar é uma excelente fonte de carbono para o cultivo de *S. maxima*. Os autores relatam que os cultivos suplementados com 3,0% v/v de vinhaça aumentaram a concentração de biomassa em $0,609 \text{ g.L}^{-1}$. E, como demonstraram Morais *et al.* (2019) a adição de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol como fonte alternativa de carbono no cultivo de *Spirulina sp.* estimulou o crescimento celular atingindo um rendimento de 3 g.L^{-1} . Assim, além da produção de biomassa, o cultivo de *Spirulinas* tem o potencial de desempenhar um papel importante na fitorremediação, removendo compostos nitrogenados, compostos fosfatados, materiais orgânicos, e metais pesados em efluentes (DOS SANTOS *et al.*, 2016; SASSANO *et al.*, 2007). Como visto, a produção da biomassa de *Spirulina* tem atrativos para uma ampla gama de produtos além da remediação de efluentes. Assim, o conceito de biorefinaria pode ser aplicado com eficácia aproveitando todas as frações da biomassa de *Spirulina*.

3.2 Biorefinarias

A tradicional Economia Linear é designada como um modelo recursos- produtos-poliuição, ou modelo tomar-fazer-descartar, enquanto que a Economia

Circular se baseia nos princípios de redução, reutilização e reciclagem (designados como 3Rs), que promove simultaneamente o desenvolvimento econômico e a proteção do meio ambiente, conseqüentemente, reduzindo o impacto ambiental (OREGE *et al.*, 2022). Dessa forma, empregar a economia circular para o aproveitamento total da biomassa em Biorefinarias de Microalgas é, presumivelmente, uma ótima tratativa de equilibrar os balanços energéticos e econômicos na exploração de cultivos e bioprodutos de microalgas. Por isso, integrar o conceito de biorefinarias com a biorremediação, tratamento de poluentes e geração nula de resíduos, tem potencial para ser um caminho mais sustentável e viável para cultivar e processar a biomassa microalgal.

O conceito de biorefinaria é semelhante ao da refinaria de petróleo tradicional. A principal diferença ocorre em termos de matéria-prima (biomassa ou petróleo bruto) e de tecnologia empregada na conversão em produtos (CHEW *et al.*, 2017). Em específico, a biorefinaria integra diferentes rotas de conversão e equipamentos no processamento dos diferentes componentes da biomassa para produzir energia, combustíveis e produtos, além de otimizar o uso dos recursos e minimizar resíduos, maximizando os benefícios e rentabilidade da instalação (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; CHEW *et al.*, 2017; KUMAR; SINGH, 2019). Logo, o conceito fundamental em biorefinaria é prospectar produtos de alto e médio valor com o uso da biomassa residual e então superar as atuais limitações econômicas que impedem a industrialização das microalgas (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

Os principais bioprodutos atualmente investigados em pesquisas são proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos, antioxidantes, gorduras insaturadas e poli-insaturadas, vitaminas, nanocelulose e bioplásticos (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020). Em específico, a biomassa de microalgas sem óleo, por exemplo, é uma fonte significativa de carboidratos, proteínas, aminoácidos, pigmentos e nutrientes (KUMAR; SINGH, 2019). Em uma biorefinaria circular de microalgas, a carga de nutrientes (N, P, K, etc) da biomassa podem voltar ao meio de cultura, além da biomassa ser suscetível a técnicas de processamento de biomoléculas (sacarificação e fermentação) ou de natureza geral (digestão anaeróbica, gaseificação, pirólise, etc.) (KUMAR; SINGH, 2019).

Para Karpagam, Jawaharraj e Gnanam (2021) a biorefinaria de microalgas deve incluir três bioprodutos cruciais que tornariam todo o processamento mais

robusto: (i) proteínas para alimentos alternativos e nutrientes essenciais, (ii) carboidratos (glicose, celulose, exopolissacarídeos e amido) para produção de bioetanol e (iii) lipídios (glicolipídios, triglicerídeos e ácido graxos livres) para produção de biodiesel. Em comparação com as plantas, as microalgas não tem raízes ou caules e, portanto, não possuem membrana plasmática extremamente resistentes (lignocelulose) que são problemáticos para decompor e explorar bioprodutos (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

As tecnologias de conversão de biomassa podem ser divididas em três rotas: físico-químicas, bioquímicas e termoquímicas. A conversão físico-química abrange a aplicação de força mecânica para a extração dos componentes bioativos da biomassa (PATRA *et al.*, 2021), como lipídios (triglicerídeos) que por transesterificação se obtém biodiesel (ésteres de ácidos graxos) e glicerol utilizando reagentes como metanol ou etanol catalisado por um ácido ou base (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

A conversão termoquímica emprega a utilização de calor, pressão e catálise para decompor termicamente a biomassa em biocombustíveis e bioprodutos. (PATRA *et al.*, 2021). As formas de transformação termoquímica incluem gaseificação (produção de gás de síntese), liquefação térmica (produção de bio-óleo), pirólise (produção de bio-óleo, gás de síntese e carvão) e queima direta ou combustão (geração de calor e eletricidade) (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

Enquanto que a conversão bioquímica abrange o bioprocessamento por microrganismos ou enzimas para a biodegradação da biomassa em biocombustíveis, tal como digestão anaeróbica (produção de biogás), fermentação (produção biometano, bioetanol e biobutanol) e geração fotobiológica de hidrogênio (biohidrogênio) (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020; PATRA *et al.*, 2021)

Bhattacharya e Goswami (2020) ainda colocam uma quarta rota de conversão, a conversão fotossintética em célula a combustível microbiana, uma conversão bioeletroquímica que produz bioenergia a partir da biodeteriorização de compostos naturais sob condições anóxicas (ausência de oxigênio).

Em específico para biomassa de microalgas, o material sólido remanescente após a produção de biodiesel são materiais sólidos ricos em carboidratos e proteínas. (KIM *et al.*, 2022). Logo, essa biomassa residual pode ser usada para a produção de bioetanol e BC a partir dos carboidratos e proteínas,

respectivamente. No entanto, alguns autores sugerem outras vias de bioprodutos para tornar a produção de biodiesel mais sustentável com a integração da produção de biohidrogênio, biogás (metano) e o residual do biodigestor, que pode ser usado como nutriente (biofertilizante) (BANERJEE *et al.*, 2019; KARPAGAM; JAWAHARRAJ; GNANAM, 2021). Como visto, existem diferentes vias e possibilidades de bioprodutos energéticos para uma biorefinaria.

Para além dos diversos biocombustíveis (bioenergia), a aplicação biotecnológica de culturas de microalgas em larga escala também tem potencial significativo nas diversas áreas de alimentos e rações, cosmética, farmacêutica, remediação ambiental e tratamento de água (NITSOS *et al.*, 2020). As gorduras insaturadas de cadeia longa, proteínas e pigmentos derivados de microalgas têm capacidades notáveis como suplementos nutricionais promotores de saúde e são de particular interesse na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de produtos de apoio ao bem-estar e ao tratamento de várias doenças (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020). Outros bioprodutos de valor agregado produzidos por microalgas incluem carotenoides (β -caroteno e astaxantina), ácidos graxos essencial ômega-3 (ácido docosaenoico e ácido eicosapentaenoico), pigmentos bioativos e naturais, corantes naturais (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

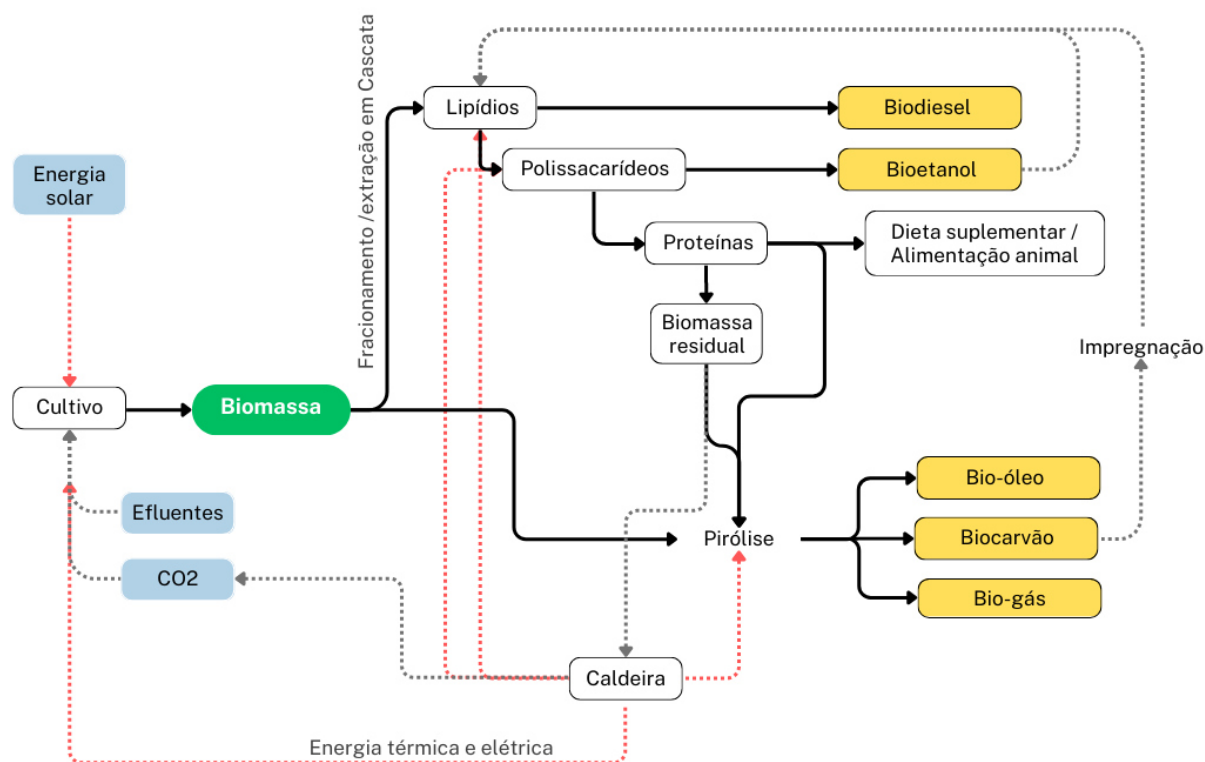
No entanto, Karpagam, Jawaharraj e Gnanam (2021) abordam que as biorefinarias focadas apenas em bioenergia teriam mais benefícios, pois produtos farmacêuticos/nutraceuticos não seriam uma opção viável devido a requisitos regulatórios envolvidos. Isto significa que a aprovação de produtos farmacêuticos/nutraceuticos por agências reguladoras não seria atingida no cenário de cultivos conduzidos com remediação de efluentes, além das exigências com reagentes de alta qualidade e pureza, que aumentaria o custo de produção.

Isto posto, Karpagam, Jawaharraj e Gnanam (2021) sugerem a exploração de biorefinarias de bioenergia com abordagem em cascata de biocombustíveis, por se adequarem melhor à produção sustentável usando a biomassa de microalgas. Segundo os autores, a abordagem de produção em cascata tem como estratégia iniciar com: (i) produção de biodiesel por via de TE (ii) produção de bioetanol a partir de biomassa remanescente após extração de lipídios/biodiesel; e (iii) biogás ou BC a partir do resíduo de biomassa de microalgas gasto após a produção de bioetanol como abordagem de produção de resíduo nula.

Como visto, diversos pesquisadores da literatura apontam para o grande potencial do uso da microalga em biorefinarias e sua diversidade de produtos de valor agregado obtidos. Em específico, as biomassas de *B. braunii* e de *S. maxima* possuem quantidades relevantes de carboidratos, proteínas, lipídios e pigmentos. Assim, uma biorefinaria com produção em cascata pode ser idealizada com seu aproveitamento para a produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biogás e bio-óleo) e BC. E, também, a integração da biorefinaria com a mitigação de CO₂ de origem fabril e tratamento de efluentes, tem potencial para reduzir custos totais de produção, bem como sustentabilidade da produção que aproximaria cada vez mais de uma biorefinaria circular de microalgas.

O processamento em cascata na biorefinaria de microalgas com as vias focadas na produção de bioenergia é apresentado na Figura 7

Figura 7 – Diagrama esquemático de processos em cascata em biorefinaria de biocombustíveis de microalgas.



Fonte: Próprio autor

Além das vias de processamento em cascata, o diagrama propõe utilizar energia solar bem como a energia (térmica ou elétrica) da queima da biomassa

residual em caldeira. Os cultivos seriam alimentados com CO₂, interno ou externo a biorefinaria, e efluentes de alta demanda bioquímica (DBO) como efluentes de laticínios, usinas de cana de açúcar ou chorume. A biomassa, dependendo da espécie, poderá ser enviada para pirólise ou fracionada nos processos em cascata: (i) o óleo convertido em biodiesel por TEIS, carboidratos convertidos em bioetanol por hidrólise e fermentação, podendo ser utilizado como reagente na TEIS, e, por fim a biomassa rica em proteínas destinada a alimentação animal. A biomassa residual poderia passar por pirólise para a obtenção de bio-óleo, biogás e BC. O BC poderia ser vendido como material adsorvente ou impregnado com catalisador para ser utilizado no processo de TEIS.

3.2.1 Lipídios e Biodiesel

As microalgas produzem uma grande variedade de compostos lipídicos, como triglicerídeos (TG), esteróis, hidrocarbonetos e ceras, sendo, os TG, os lipídios mais abundantes e melhor descrito entre as classes lipídicas de microalgas pela literatura (MORALES; AFLALO; BERNARD, 2021). Os lipídios produzidos pelas microalgas podem ser divididos em duas categorias principais: lipídios polares (glicolipídios e fosfolipídios) e apolares, ou lipídios neutros (ácidos graxos livres, TG e esteróis) e possuem duas funções específicas dentro da célula: estrutural e de armazenamento energia (RUSSELL; RODRIGUEZ; YASEEN, 2022). Os lipídios polares, ou lipídios de membrana, conferem suporte estrutural para as membranas e organelas, enquanto que os lipídios apolares são a principal forma de armazenamento de energia (TG) (MORALES; AFLALO; BERNARD, 2021).

Em comparação com óleos vegetais, os lipídios de microalgas tem uma composição de ácidos graxos mais diversificada, porém o mais recorrente são ácidos graxos com comprimento de cadeia de 12, 16 e 18 carbonos, com algumas espécies produzindo ácidos graxos de até 24 carbonos (MORALES; AFLALO; BERNARD, 2021). Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, sigla do inglês), alguns são raramente encontrados em óleos vegetais, também podem estar presentes na fração lipídica de microalgas, sendo que PUFAs de cadeia longa são os mais desejados nas commodities nutracêuticas e alimentícias (MORALES; AFLALO; BERNARD, 2021). Os PUFAs derivados de microalgas são uma alternativa

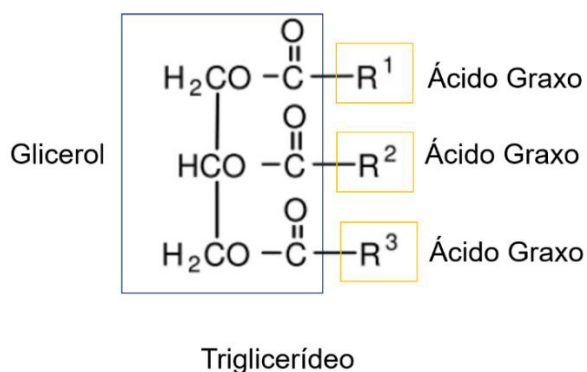
vegetariana para substituir o óleo de peixe e podem atender o mercado especializado nesse segmento de produtos (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

Os lipídios são sintetizados nos tilacoides (membranas internas do cloroplasto) e no retículo endoplasmático das células, e sua produção é influenciada por muitos fatores externos (condições de estresse) como temperatura, pH, intensidade de luz e cor, ou falta de nutrientes, que perturbam os processos anabólicos (MIMOUNI *et al.*, 2018; MORALES; AFLALO; BERNARD, 2021; SONG *et al.*, 2022). Esses lipídios são armazenados no citosol como gotículas lipídicas (MIMOUNI *et al.*, 2018).

Segundo Russell, Rodriguez e Yaseen (2022), a extração dos lipídios é considerada a etapa de maior custo no processo de produção de biocombustíveis devido ao alto consumo de energia na secagem e extração dos lipídios durante a etapa de colheita da biomassa. Os autores explicam que, dentre os vários métodos utilizados para extrair lipídios das microalgas, o método mais convencional é o uso de moinho de bolas agitado e extração por solventes orgânicos (chamado método de Bligh & Dyer) que interagem com as moléculas lipídica e com a estrutura da proteína celular e exposição dos lipídios.

Os TG são caracterizados por um, dois ou três grupos de ácidos graxos ligados a uma estrutura de glicerol (Figura 8) e são dirigidos à produção de biodiesel.

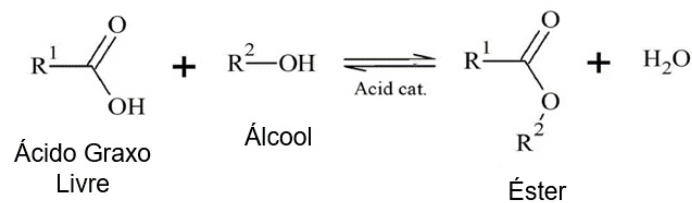
Figura 8 - Estrutura molecular do Triglicerídeo: estrutura de glicerol ligado a até 3 tipos de ácidos graxos (cadeias carbônicas R1, R2 e R3).



Fonte: Adaptado de VÖLZ (2009)

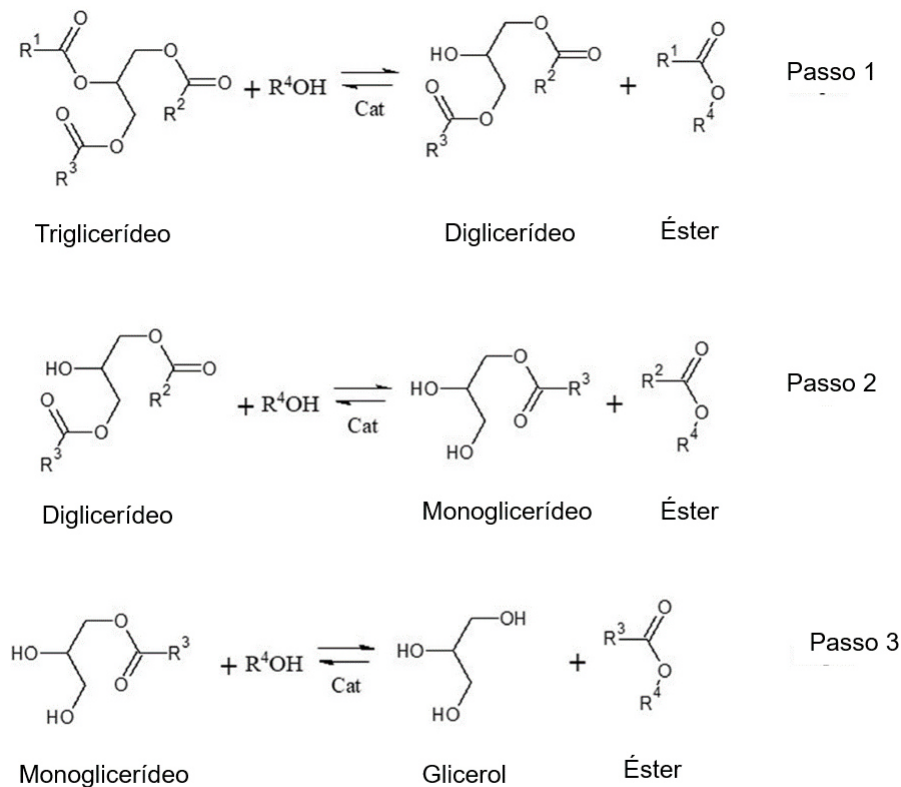
O termo biodiesel se refere aos ésteres de ácido graxos derivados de óleos vegetais (TG e ácidos graxos livres) extraído de biomassa oleaginosas ou gordura animal. Os ésteres de ácido graxo são obtidos pela reação de TE dos TG e pela esterificação dos ácidos graxos livres (AGL). Ambas reações envolve a reação com álcoois de cadeia molecular curta com a presença de um catalisador (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016). Ambas reações são representadas nas Figura 9 e Figura 10.

Figura 9 - Representação da reação de esterificação do ácido graxo livre.



Fonte: Traduzido de Fonseca *et al.* (2022)

Figura 10 - Representação da reação de TE de TG



R⁴ = Radical do álcool

Fonte: Traduzido de Fonseca *et al.* (2022)

O mecanismo da reação de TE (Figura 10) consiste de reações consecutivas e reversíveis onde 1 mol de tri, di ou monoglicerídeo reage com 1 mol de álcool e 1 mol de éster (biodiesel) é formado em cada etapa (LOURINHO; BRITO, 2015). Na primeira etapa (Figura 10, Passo 1) os TG são reduzidos a diglicerídeos, os quais são reduzidos a monoglicerídeos no segundo passo (Figura 10, Passo 2), e, por último, no terceiro passo (Figura 10, Passo 3) os monoglicerídeos são reduzidos a glicerol como subproduto. Já o mecanismo da reação de esterificação (Figura 9) consiste na reação, também reversível, de 1 mol de AGL com 1 mol de álcool formando um 1 mol de éster e 1 mol de H₂O como subproduto.

A reação de TE ocorre tanto por catálise ácida quanto básica. No entanto, a reação de esterificação acontece por catálise ácida, pois a catálise básica acarreta na hidrólise alcalina do AGL resultando em sabão (reação de saponificação). No entanto, as duas reações acontecem simultaneamente. Por consequência, a escolha do catalisador ácido ou básico para conversão do óleo é sempre inerente ao índice de acidez. Óleos com índice de acidez até 3 mg KOH.g⁻¹ podem passar por catálise básica uma vez que as perdas com saponificação são pouco significativas (VÖLZ, 2009). Visto que o óleo extraído da biomassa de microalgas possui uma quantidade alta de AGL, como apresentado por Loures *et al.* (2018), 12,8% de AGL e índice de acidez de 26,1 mg KOH.g⁻¹, a catálise básica do óleo da microalga comprometeria o rendimento da conversão em ésteres. Isto é, devido à alta acidez do óleo de microalgas, os AGL presentes na fração lipídica seriam saponificados, diminuindo o rendimento em ésteres.

Os álcoois comumente utilizados na literatura são o metanol (rota metílica) ou o etanol (rota etílica). Existe uma diferenciação quanto ao éster formado em cada rota: (i) éster metílico, éster resultante da reação com metanol, e (ii) éster etílico, éster resultante da reação com etanol. No entanto, sabe-se que o metanol é uma substância tóxica, enquanto o etanol é consideravelmente menos tóxico (VEGA-GUERRERO; GÓMEZ-CASTRO; LÓPEZ-MOLINA, 2022). No Brasil, a rota etílica traz vantagens devido ao grande número de usinas de etanol de cana de açúcar (etanol de segunda geração) no território nacional (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; SILVA *et al.*, 2015), e é responsável pela produção de 29,97

bilhões de litros de etanol em 2021 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2022), além de ser uma alternativa renovável e menos tóxica.

Em relação ao diesel convencional, o biodiesel apresenta diversas vantagens como a de ser renovável, sustentável, biodegradável, não tóxico, alto teor de oxigênio, enquanto produz menor emissão de carbono, dióxidos de enxofre e gases não queimados e o fato de não liberar partículas no meio ambiente (BALAJII; NIJU, 2019; FU *et al.*, 2013).

Comercialmente, o biodiesel é derivado de matérias-primas comestíveis (primeira geração) e não comestíveis (segunda geração), além de ser comprovadamente renovável, ecologicamente correto e um biocombustível de alta qualidade (LEE *et al.*, 2022). Segundo a ANP (2022), a soja continua sendo a principal matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil em 2021, representando 72,1% do total. No entanto, a concorrência da matéria-prima de primeira geração para o consumo humano com a produção de biocombustíveis pode elevar os preços dos alimentos, além de requerer grandes áreas de terras para produção da matéria-prima em terras férteis limitadas para recursos alimentares humanos (LEE *et al.*, 2022). Isto posto, ter a biomassa de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel traria impacto negativo menor e eliminaria questões competitivas de fonte de alimentos e de geração de energia que aconteceriam com a matéria-prima de primeira geração, especialmente os biocombustíveis a partir de milho e soja (FU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2022).

Convencionalmente, a extração do óleo de microalgas aplica a destruição físico-química da biomassa de células secas antes do processo de TE para produzir os ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (LOH *et al.*, 2021). No entanto, o método extração convencional é uma grande limitação para a produção do biodiesel de microalgas, e interfere diretamente no custo de produção. Para o alto rendimento da produção do biodiesel de microalgas, o processamento da biomassa de microalgas necessita de pré-tratamentos vigorosos, como desidratação, secagem, a própria esterificação dos lipídios e purificação do produto, tornando o processo economicamente não atraente devido ao grande consumo de energia (KIM *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a TEIS surge como alternativa de economia para a produção de biodiesel de microalgas. A TEIS, ou transesterificação direta, trata da extração e reação acontecerem concomitantemente e *in loco*. Ou seja, a TEIS

permite a conversão direta da biomassa de microalgas em biodiesel evitando as etapas sequenciais de secagem e extração de lipídios, o que posteriormente reduz o custo de produção (KARPAGAM; JAWAHARRAJ; GNANAM, 2021; KIM *et al.*, 2022). A TEIS é melhor discutida no item 3.5.

O processamento combinado e integrado da biomassa é uma abordagem viável para biorefinarias, primeiramente com a produção de biodiesel por TEIS do lipídios; seguida da utilização da biomassa residual, ainda com carboidratos, ser convertida em bioetanol, para que fontes vegetais tradicionais de carboidratos (biomassa lignocelulósica ou açúcares simples) possam ser substituídos, e o remanescente da biomassa, rica em proteína, pode ser efetivamente usada para a produção de biogás ou BC (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020; KARPAGAM; JAWAHARRAJ; GNANAM, 2021).

3.2.2 Carboidratos e Bioetanol

Carboidratos podem ser classificados em açúcares (monossacarídeos) e seus polímeros (di-, oligo-, e polissacarídeos). Em microrganismos, os carboidratos são sintetizados dentro do cloroplasto ou citosol, e sua produção também serve para dois principais propósitos no microrganismo: atuam como componente estrutural na parede celular, e como componente de armazenamento de energia para o processo metabólico do microrganismo (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Essas reservas de carboidratos são dependentes da espécie. Em cianobactérias é sintetizado glicogênio e em algas verdes (clorofitas) são sintetizados polissacarídeos amilopectina (LOEWUS; TANNER, 1982).

Em geral, os carboidratos mais abundantes no hidrolisado de microalgas ou cianobactérias são glicose, ramnose, xilose e manose (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Os carboidratos em células de microalgas são derivados na maior parte por celulose e amido com muito menos lignina ou sem lignina, e atuam como fonte de carbono prontamente acessível para a indústria de bioetanol, biobutanol e cervejeira (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020).

Para a produção de bioetanol, a biomassa passa por hidrólise onde as macromoléculas complexas são quebradas em micromoléculas simples, isto é, os carboidratos presentes na biomassa de microalgas devem ser primeiro hidrolisados (processo de sacarificação) para açúcares simples (glicose, frutose, etc.) para que

possam ser fermentados pelas leveduras etanologênicas (CHI *et al.*, 2021; MARKOU *et al.*, 2013). Geralmente, a hidrólise é praticada nas indústrias para converter celulose em glicose monossacarídica com a ajuda de catalisadores (CHI *et al.*, 2021).

Kim *et al.* (2022) ressaltam que a ausência de lignina nas microalgas pode melhorar a cinética da reação de fermentação e o rendimento dos biocombustíveis, pois não exige processos vigorosos de pré-tratamento. Isso, porque, a lignina possui uma estrutura rígida e complexa, que raramente é degradada durante a fermentação. Consequentemente, o processo de hidrólise em biomassa de microalgas requer menos pré-tratamento devido a fácil sacarificação dos carboidratos, portanto, a fermentação é uma abordagem altamente vantajosa e competitiva em comparação a biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de bioetanol em biorefinarias, devido ao teor de lignina relativamente menor em microalgas (CHEN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2022).

Sob condições adequadas de cultivo, as microalgas podem acumular mais de 50% de carboidrato intracelular (amido e celulose), com baixo teor de hemicelulose e ausência de lignina, possibilitando a pronta conversão dos açúcares fermentescíveis (CHEN *et al.*, 2013). Em vista disso, existe um potencial da biomassa residual após a TEIS para ser utilizada na produção de bioetanol. Anteriormente, em nosso estudo (PEDRO *et al.*, 2021), foi demonstrado que os açúcares redutores da biomassa de microalgas são fortemente preservados nas reações de TEIS catalisadas por HCl (30-32%), enquanto que os experimentos realizados com H₂SO₄ tiveram as menores concentrações de açúcares no hidrolisado. A menor concentração de açúcares em TEIS catalisada por H₂SO₄ é, provavelmente, devido a desidratação de carboidratos e formação de compostos como hidroximetilfurfural e furfural (ISAZA-PÉREZ *et al.*, 2020; REIS; ZHANG; HU, 2014). Portanto, a perda mínima de açúcar durante o processo de TEIS viabilizam a aplicação de biorefinaria em cascata.

3.2.3 Pigmentos

Em microrganismos fotossintéticos, como as microalgas, três tipos fundamentais de pigmentos comuns podem ser destacados: os carotenoides, as clorofilas e as ficobiliproteínas. (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020). Estes são

pigmentos fotossintéticos que capturam a energia luminosa utilizada durante a fotossíntese (VONSHAK, 1997). A maior parte dessa energia luminosa é coletada por pigmentos acessórios, pois a clorofila absorve energia luminosa somente em uma região limitada do espectro solar, assim abrangendo maior região do espectro pelos demais pigmentos (REIS *et al.*, 1998).

Os pigmentos são reconhecidos como precursores de vitaminas em alimentos e nutrição, mas também estendem seu uso para ração animal, aditivos alimentares, cosméticos, farmacêuticos e corantes alimentares (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020). As ficobiliproteínas têm recebido grande atenção devido às suas aplicações na indústria farmacêutica (marcador fluorescente), cosmética e também na indústria alimentícia (como corante natural) (TAVANANDI; RAGHAVARAO, 2019).

Em cianobactérias, como a *S. maxima*, os pigmentos coletores de luz incluem clorofila-a, carotenoides e ficobiliproteínas, sendo então uma excelente fonte natural destes pigmentos que são utilizados como corantes alimentícios (REIS *et al.*, 1998; TAVANANDI; RAGHAVARAO, 2019). Embora a clorofila também seja utilizada como agente colorante em alimentos e cosméticos, a ficocianina, uma ficobiliproteína responsável por captar cerca de 50% da luz em cianobactérias, tem recebido maior atenção pelas aplicações farmacêuticas e cosméticas pois apresenta propriedades neuroprotetora, hepatoprotetora, anti-inflamatória e antioxidante (TAVANANDI *et al.*, 2018; TAVANANDI; RAGHAVARAO, 2019). Em cianobactérias, cerca de 20% de toda fração proteica corresponde a ficocianina (VONSHAK, 1997).

Assim, a cianobactéria *S. maxima* fornece vantagens técnicas e comerciais devido à alta concentração desses pigmentos, o que aumentaria significativamente a efetividade geral em biorefinarias.

3.2.4 Biocarvão (BC)

BC designa um material resultante do processo de conversão termoquímica sob condições livres ou limitadas de oxigênio, sendo, então, um produto sólido, poroso, insolúvel, estável, rico em carbono, gerado a partir de fontes renováveis, neutras da emissão de gases de efeito estufa, como por exemplo, biomassa (LEE; KIM; KWON, 2017; WANG *et al.*, 2019)

As propriedades gerais de um BC abrangem insolubilidade, estabilidade, porosidade e aromaticidade, que podem proporcionar um caráter adsorvente ao BC (LAW *et al.*, 2022). Estruturalmente, o BC é organizado com anéis de carbono aromáticos empilhados aleatoriamente e irregularmente (amorfo), com camadas mantidas por ligações carbono-carbono, e classificado como não grafitizável (CHI *et al.*, 2021).

BCs são provenientes da conversão térmica de biomassas, como a biomassa de microalgas ou, como vem sendo abordado no conceito de biorefinaria em cascata, a biomassa residual após TEIS e hidrólise (sacarificação). Embora exista um alto teor de nitrogênio (ricos em proteínas) em resíduos sólidos de microalgas, que podem ser aplicados como nutriente na produção anaeróbica de hidrogênio (H₂) através da fermentação bacteriana por exemplo (KIM *et al.*, 2022), a produção do BC de biomassa residual de microalgas tem vantagens e inúmeras aplicações em várias áreas com demanda crescente como no tratamento de efluentes, captura e sequestro de carbono, remediação de poluição ambiental em água/solo/ar, enriquecimento/fertilidade do solo, produtos farmacêuticos, cosméticos, biomedicina, catálise, armazenamento e purificação de gás, dispositivos eletrônicos e biocompósitos (PATRA *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021).

As técnicas de conversão termoquímica de biomassa e propriedades físico-químicas do BC são detalhadas nos capítulos a seguir (Capítulo 3.3).

3.3 Conversão termoquímica

A conversão termoquímica de biomassas compreende a decomposição da biomassa através da energia térmica. Este tratamento térmico submete a biomassa a altas temperaturas em condição anóxica (ausência de oxigênio) e geram bioprodutos como o BC, biogás e bio-óleo, que pode ser diretamente utilizado para substituir os combustíveis fósseis (CHAIWONG *et al.*, 2013a; LI; JIANG, 2017).

A biomassa é definida como um material biológico derivado de organismos vivos ou correlatos (LI; JIANG, 2017). Estruturalmente, a biomassa é um biopolímero complexo e heterogêneo, que pode ser constituído por carboidratos, celulose, hemicelulose, proteínas, lignina, lipídios, água, cinzas e outros componentes traço. (LEE *et al.*, 2020). Muitas vezes, o termo biomassa se refere às plantas ou material a base de plantas (LI; JIANG, 2017). No entanto,

dependendo de seus constituintes químicos, existem dois grupos principais de biomassa: a biomassa não-lignocelulósica, e a biomassa lignocelulósica.

A biomassa lignocelulósica é geralmente um vegetal (ou resíduo vegetal) não comestível como biomassa florestal, resíduo agrícola ou culturas dedicadas, e normalmente contém lignina, um polímero aromático (10–25% em peso), e polímeros de carboidratos: hemicelulose (20–40% em peso) e celulose (25–45% em peso), juntamente com extrativos e cinzas (LI; JIANG, 2017; PATRA *et al.*, 2021), Em geral, compreende plantas, sementes, e cascas.

A biomassa não-lignocelulósica compreende as biomassas que contém animais, microrganismos e materiais derivados de plantas, cuja composição inclui principalmente proteínas, lipídios, sacarídeos, inorgânicos e celulose (LI; JIANG, 2017). Em geral, são animais, açúcar, lodo, esterco, pelos, penas, ossos e microrganismos (microalgas, fungos e bactérias).

Apesar da composição bioquímica complexa, a biomassa de microalgas é uma biomassa não lignocelulósica com três componentes principais: proteínas, lipídios e carboidratos (YANG *et al.*, 2019), o que mostra um grande potencial como matéria-prima em processos de conversão termoquímica para a geração de bioprodutos de alta densidade energética e valor agregado. No entanto, existem vários processos termoquímicos envolvidos na conversão da biomassa e os constituintes químicos das microalgas apresentam grandes variações em seus teores de lipídios, carboidratos e proteínas, o que contribui diferentemente na qualidade dos bioprodutos obtidos (LAW *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2020). Assim, cada biomassa tem sua característica e resulta em quantidades e qualidades diferentes em bioprodutos.

É estimado que a produção de carvão ativado (CA) em todo mundo seja cerca de 100.00 toneladas por ano, no entanto, as fontes de matéria-prima em escala comercial são madeira, carvão mineral de antracito e betume, linhita (rocha sedimentar, 70% carvão), cascas de turfa e coco, ou seja, materiais lignocelulósicos (HEIDARINEJAD *et al.*, 2020). Contudo, a produção de BC de não-lignocelulósicos vem com o propósito de alcançar a gestão de valor agregado dos resíduos tendo o BC como um subproduto (LI; JIANG, 2017). No entanto, o BC de não-lignocelulósicos, em especial o BC de microalgas, pode ser aproveitado pelas suas características físico-químicas e gestão de resíduos vantajosa e suprir a demanda de CA. As partículas de BC de microalgas se mostraram compactas e irregulares,

que se diferem da estrutura da biomassa, enquanto que, os BCs de biomassa lignocelulósica normalmente retêm as propriedades estruturais da biomassa (SINGH *et al.*, 2021).

As principais técnicas em conversão termoquímica de biomassas são a gaseificação, torrefação, pirólise e carbonização hidrotermal. Estas técnicas podem ser empregadas para produzir BC à base de microalgas com propriedades físico-químicas desejáveis, como alta área superficial e volume de poros, abundantes grupos funcionais de superfície, bem como funcionalidade como alta capacidade de adsorção (LAW *et al.*, 2022). Tanto a pirólise quanto a gaseificação são processos termoquímicos que podem converter a biomassa residual de microalgas em três produtos: BC, bio-óleo e biogás (KIM *et al.*, 2022). Enquanto que, em contraste, a carbonização hidrotérmica usa a biomassa úmida (pasta de microalgas) para produzir bio-óleo mais denso em energia (KIM *et al.*, 2022). Estas técnicas de termoconversão são aprofundadas a seguir.

3.3.1 Gaseificação

A gaseificação destina-se a produção de gás de síntese a partir de biomassa (KIM *et al.*, 2022). A gaseificação refere-se à conversão termoquímica da biomassa, catalisado ou não, em uma mistura gasosa (gás de síntese) de hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) com a formação de alguns hidrocarbonetos (ARAVIND *et al.*, 2020).

O processo ocorre com o aquecimento da biomassa em temperaturas maiores que $700^\circ C$ sem combustão (ausência de ar) ou com uma quantidade controlada de oxigênio e vapor, diferenciando-se da combustão (oxidação da biomassa reagida com oxigênio produzindo calor e luz rapidamente) que produz uma quantidade de resíduo sólido relevante (ARAVIND *et al.*, 2020). Para a gaseificação, oxidantes como vapor, ar ou dióxido de carbono são usados para oxidação de material sólido à base de carbono, resultando na formação da mistura gasosa (gás de síntese) (KIM *et al.*, 2022). Em comparação à pirólise, na gaseificação a temperatura é mais alta atingindo até $1.300^\circ C$ (KIM *et al.*, 2022).

3.3.2 Pirólise

A pirólise é um processo de conversão termoquímica simples de matéria orgânica que opera em atmosfera livre de oxigênio em altas temperaturas na faixa de 300 a 700 °C (SEKAR *et al.*, 2021). O processo pirolítico resulta na produção de bioprodutos combustíveis como bio-óleo, BC e biogás. A composição do biogás consiste em gases não condensáveis como CO₂, CO, CH₄ e H₂, que podem ser utilizados para a geração combinada de calor e energia, enquanto bio-óleo é um produto líquido geralmente composto por hidrocarbonetos oxigenados, tais como: ésteres fenólicos, alquilas, ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos (PATRA *et al.*, 2021). A formação do BC ocorre pela reação de carbonização devido a desoxigenação e desidrogenação da biomassa (KIM *et al.*, 2022).

O processo de pirólise é classificado em pirólise lenta e pirólise rápida (ou flash) com base na diferença nas condições de operação (taxa de aquecimento, tempo de residência e temperatura), e ainda podem ser assistida por micro-ondas e catalisada (SEKAR *et al.*, 2021).

Na pirólise lenta, a biomassa é aquecida lentamente com taxa de aquecimento com variação de 0,1-1°C.s⁻¹ até a temperatura desejada e o tempo de residência varia de minutos a hora (SEKAR *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2019). A pirólise lenta das microalgas em baixa temperatura (350°C) permite obter rendimentos consideráveis de óleo, até 15% a mais que a biomassa lignocelulósica (BINDA *et al.*, 2020).

Na pirólise rápida (ou flash) é utilizada uma taxa de aquecimento muito mais alta, geralmente a uma taxa de aquecimento de 10-1000°C.s⁻¹, com tamanho de partícula de biomassa menor que 0,2 mm e menor tempo de residência (SEKAR *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2019). A pirólise rápida é mais vantajosa para produção de bio-óleo devido ao baixo craqueamento secundário, baixa condensação e menor polimerização durante o processo (SEKAR *et al.*, 2021), e assim, proporciona maiores rendimentos de bio-óleo, tipicamente, 60-75% em peso da biomassa inicial (YANG *et al.*, 2019). No entanto, normalmente a produção do bioproduto principal depende da matéria-prima e controles do processo (SEKAR *et al.*, 2021).

Em consequência, a temperatura e taxa de aquecimento durante a pirólise são as variáveis controladas para a produção destes bioprodutos. Com o

favorecimento de maior produção de bio-óleo na pirólise rápida, enquanto que há o favorecimento de maior produção de BC na pirólise lenta.

Além disso, a temperatura de pirólise também influencia as propriedades do BC, como área de superfície e grupos funcionais de superfície (CHI *et al.*, 2021). No processamento da biomassa de microalgas, a fração lipídica da biomassa gera bio-óleo enquanto que a fração em carboidratos e proteínas da biomassa gera BC (SINGH *et al.*, 2021).

Durante a formação do BC acontecem várias reações químicas de decomposição da biomassa como despolimerização de elementos poliméricos, rearranjo, desidratação, descarboxilação, condensação intramolecular e aromatização (LIU; JIANG; YU, 2015). ARAVIND *et al.* (2020) e CHI *et al.* (2021) simplificam a decomposição pirolítica de biomassas em três etapas principais de reações: (1) ocorre a desidratação da biomassa em temperaturas inferiores a 200°C; (2) seguido do principal processo que ocorre a 200-550°C, a desvolatilização, formação primária do BC onde alguns componentes voláteis e gases são perdidos; e na última etapa (3), ocorre a decomposição sólida em temperaturas acima de 550°C, onde o BC secundário é formado pela lenta decomposição do BC primário.

Acerca da temperatura final de pirólise, o BC de pirólise de baixa temperatura geralmente possui área superficial menor (bloqueada pela formação de alcatrão), estruturas porosas não desenvolvidas, pH ácido e baixo teor de carbono, enquanto que em temperaturas mais altas a matéria volátil é liberada do BC e resulta na abertura de suas estruturas porosas (PATRA *et al.*, 2021). O pH do BC de microalgas tende a aumentar à medida que a temperatura pirolítica aumenta (POO *et al.*, 2018) pois o pH está diretamente ligado aos grupos funcionais contendo oxigênio que estão presentes na superfície do BC (SINGH *et al.*, 2021). Em temperaturas de 200-300°C, a celulose se decompõe em compostos fenólicos e ácidos orgânicos que abaixa o pH, enquanto que acima de 300°C os sais alcalinos se dissociam da matriz da biomassa e aumentam o pH (POO *et al.*, 2018).

A pirólise em altas temperaturas promovem o aumento da área de superfície e porosidade do BC devido à quebra de alquilas alifáticas e grupo éster dos compostos orgânicos, removendo, assim, as substâncias que bloqueiam poros e, também, rearranjando as ligações químicas e introduzindo novos grupos funcionais de superfície, como carboxila, lactona, fenol e piridina (CHI *et al.*, 2021).

Por conta desse rearranjo das ligações e superfície, o BC produzido em altas temperaturas tem por característica ser hidrofóbico, enquanto que o BC produzido em baixa temperatura de pirólise tem por característica ser hidrofílico (CHI *et al.*, 2021). E, segundo Simão *et al.* (2018), é observado maior rendimento em hidrocarbonetos aromáticos e uma diminuição de compostos oxigenados no bio-óleo ao elevar a temperatura da conversão térmica de 450 a 650°C.

Os constituintes químicos das microalgas são favoráveis como matéria-prima para pirólise e podem influenciar as características do bioproduto, como pH, viscosidades, densidades, valores de poder calorífico e sua composição (LEE *et al.*, 2020). Todas as biomassas de microalgas apresentam um rendimento de bio-óleo notável em comparação com a biomassa lignocelulósica, que pode ser usada como fonte de energia para alcançar um processo de produção sustentável e verde (BINDA *et al.*, 2020). E segundo Simão *et al.* (2018), o bio-óleo extraído da biomassa proteica é mais estável em comparação ao bio-óleo extraído da biomassa lignocelulósica, por possuir menor teor de oxigênio e maior poder calorífico.

Pequenas quantidades de minerais metálicos inorgânico (Íons de metais alcalinos e alcalino-terrosos) presentes na biomassa de microalgas pode formar um íon complexo metálico-água com grupos funcionais (principalmente hidroxila e aldeídos) que atuam como catalisadores na reação de desidratação durante a pirólise, no entanto, os BCs de microalgas produzidos são geralmente alcalinos (SINGH *et al.*, 2021).

Na pirólise catalítica, catalisadores (do tipo ácido, do tipo base, do tipo metal ou mistura de diferentes materiais) são aplicados para melhorar o processo de pirólise e as características dos produtos de valor agregado (LAW *et al.*, 2022). Durante o processo de pirólise, a presença de um catalisador promove reações de craqueamento e melhora dos vapores resultantes por reduzir os teores de oxigênio e/ou nitrogênio nestes compostos (SIMÃO *et al.*, 2018). O processo pode ser dividido em pirólise catalítica primária e secundária. A pirólise catalítica primária é um método *in situ* onde a biomassa é misturada com catalisadores em um pirolisador convencional, enquanto a pirólise catalítica secundária é um método *ex situ* que consiste em um leito de catalisador modificado onde os catalisadores são fixados ao pirolisador (LAW *et al.*, 2022). A pirólise catalítica mostrou alta conversão da biomassa de microalgas, alta seletividade para compostos aromáticos no bio-óleo e produção de bio-óleo com baixo teor de N (LEE; KWON; PARK, 2019).

A pirólise é uma das tecnologias mais populares e maduras que tem sido usada na requalificação da biomassa em BC de valor agregado. (LAW *et al.*, 2022), além do balanço energético dos biocombustíveis pirólíticos ser positivo (KIM *et al.*, 2022). E apesar dos avançados métodos de pirólise (pirólise catalítica, pirólise assistida por micro-ondas), a pirólise convencional ainda oferece uma das tecnologias mais viáveis em termos de custo de processo. (LEE *et al.*, 2020).

Com grande diferenciação das outras biomassas, as microalgas mostram boa adequação como matéria-prima de pirólise para produzir produtos densos em energia (LEE *et al.*, 2020). E, ainda, a pirólise da biomassa residual de TEIS não requer pré-tratamento pois o teor de água e solventes na biomassa pode ser facilmente seco em um reator de pirólise (KIM *et al.*, 2022).

No entanto, as aplicações potenciais do BC obtido a partir de microalgas vai muito além do uso comum (combustível sólido, carvão ativado, condicionador de solo), as aplicações em potenciais ainda são pouco exploradas, em específico, a aplicação como catalisador eficiente para a produção de biocombustíveis (BINDA *et al.*, 2020; SEKAR *et al.*, 2021).

3.3.3 Torrefação

A torrefação é um processo termoquímico relativamente suave (PATRA *et al.*, 2021), considerada uma pirólise leve ou pirólise a baixa temperatura (GAN *et al.*, 2018), ou, ainda, um processo de pré-tratamento de biomassa seca para remover compostos voláteis antes da pirólise (LAW *et al.*, 2022). A torrefação é frequentemente proposta como um método alternativo de pré-tratamento para melhorar as propriedades físico-químicas da biomassa (como combustível sólido) aumentando o poder calorífico e a densidade energética do BC de microalgas (GAN *et al.*, 2018; PATRA *et al.*, 2021).

O processo de torrefação de biomassas resultam em alcatrão, gases voláteis e biomassa torrificada (ou BC), ou seja, resulta na produção de combustíveis sólidos homogêneos com biopolímeros (hemicelulose, celulose e lignina) parcialmente reduzidos, com baixo teor de umidade e maior teor de carbono (PATRA *et al.*, 2021).

A torrefação seca converte a biomassa em BC em temperaturas entre 200 e 300 °C sob pressão atmosférica com ausência de oxigênio (utiliza nitrogênio

inerte) (GAN *et al.*, 2018; LAW *et al.*, 2022). Grupos hidroxila da biomassa são removidos durante a torrefação e produzem grupos hidrofóbicos na superfície do BC (GAN *et al.*, 2018).

Patra *et al.* (2021) listam algumas das vantagens da torrefação: (1) redução do teor de umidade da biomassa, (2) melhora da hidrofobicidade da biomassa, (3) aumenta da densidade de energia, (4) maior facilidade de moagem, (5) maior reatividade, (6) maior resistência à decomposição microbiana devido ao menor teor de umidade, (7) armazenamento e manuseio compactado, e (8) significativa redução da emissão de CO₂ na queima do BC.

3.3.4 Carbonização hidrotermal

A Torrefação úmida ou carbonização hidrotermal é um outro processo de conversão termoquímica de biomassas recente e promissor para a produção de hidrocarvão (HC) a partir de biomassa de microalgas. (LAW *et al.*, 2022).

Em comparação com a torrefação convencional, ou torrefação seca, a carbonização hidrotermal aquece a biomassa em meio aquoso a temperaturas subcríticas (175–260 °C), dentro de curto tempo de residência (5-30 min) e sob pressão de 2 a 6 Mpa para produzir HC como principal produto. (GAN *et al.*, 2018; LAW *et al.*, 2022). Durante o processo de carbonização hidrotermal, a água subcrítica (mantida em fase líquida durante o processo) atua como meio de reação e solubiliza efetivamente a maioria dos elementos da biomassa e é adequada para a reação de decomposição da biomassa (GAN *et al.*, 2018). O processo de carbonização hidrotermal produz produtos finais como HC (sólido), bio-óleo (líquido) e biogás, além de produzir produtos com maior densidade energética e produzir produtos sólidos com melhor hidrofobicidade e menor teor de cinzas, o que afeta crucialmente a adsorvidade do BC resultante (LAW *et al.*, 2022).

3.4 Características do BC

A estrutura física e estado químico do BC, como estrutura de poros e espécies químicas, tem efeitos significativos nas propriedades do BC em aplicações como adsorção de contaminantes, catálise e armazenamento de

energia (LI; JIANG, 2017). Segundo Patra *et al.* (2021) existem alguns parâmetros-chave que determinam as propriedades finais do BC: (1) propriedades da matéria-prima, isso inclui sua composição biopolimérica, composição elementar, teor de cinzas e tamanho de partícula; (2) tipo de processo de conversão e tecnologia do reator; (3) condições de reação, por exemplo, taxa de aquecimento, tempo de residência, tempo de reação, concentração de alimentação e catalisadores.

Li e Jiang (2017) resumizam as análises estruturais e composicional em: 1) estrutura de poros (área superficial, volume de poro, distribuição do tamanho de poros); 2) micromorfologia observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET); 3) análise elementar de C, H, N, O e S (espectrometria de emissão atômica com plasma ou espectrometria de massa; e 4) análise do estado químico (espécies químicas, grupos funcionais, ânion, cátion, etc.) por espectroscopia de infravermelho, difração de raios X e ressonância magnética nuclear de estado sólido. Essas são análises frequentemente empregadas para determinar as propriedades do BC conforme a variação dos parâmetros-chave citados no parágrafo anterior.

3.4.1 Propriedades físico-química do BC

3.4.1.1 Área de superfície e porosidade

As propriedades físicas de superfície como área de superfície específica, volume de poros e distribuição de tamanho de poros do BC bruto e ativado são determinadas para verificar a eficácia do processo de conversão termoquímica ou da metodologia de ativação (BALAJII; NIJU, 2019). A área de superfície e a porosidade são propriedades físicas importantes do BC, pois demonstra o potencial em muitas aplicações do BC como tratamento de águas residuais e remediação de solo (LENG *et al.*, 2021).

A análise tradicional de estrutura de poros de BC pode ser detalhada empregando experimentos de adsorção-dessorção de gás pela amostra de BC (LI; JIANG, 2017). A análise de Brunauer-Emmett-Teller (BET) envolve a adsorção física de moléculas de gás (principalmente nitrogênio – N₂) na superfície sólida (amostra) (BALAJII; NIJU, 2019). Geralmente, o BC bruto (nativo) e BC produzido

em baixa temperatura de pirólise possui porosidade considerada baixa com área de superfície específica abaixo de $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e volume de poro abaixo de $0,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ que, no entanto, podem ser melhoradas com ativações químicas ou físicas atingindo, por exemplo, área de superfície acima de $2000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (LI; JIANG, 2017; PATRA *et al.*, 2021). Em especial, os BCs de microalgas possuem baixa área superficial dependendo da espécie e metodologia, variando de $21 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para biomassa da microalgas silvestres (CHAKRABORTY *et al.*, 2020), $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para biomassa residual de TEIS carbonizada com H_2SO_4 (FU *et al.*, 2013), e $2,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para biomassa de *C. vulgaris* comercial (SOTOUDEHNIKARANI; ALAYAT; MCDONALD, 2019). Em alguns casos, a área de superfície específica pode diminuir após a ativação química agressiva, o fato é atribuído à desintegração dos poros do BC e à fixação bem-sucedida de grupos funcionais (BALAJII; NIJU, 2019).

3.4.1.2 Análise termogravimétrica (decomposição térmica)

A análise termogravimétrica (TGA) é utilizada para avaliar a estabilidade térmica das amostras de biomassa e BC nativo ou BC funcionalizado (BALAJII; NIJU, 2019). A TGA permite identificar a capacidade de uma biomassa liberar material volátil ou produzir resíduo sólido em um processo de pirólise, possibilitando a simulação do processo. A TGA é uma técnica analítica que mede a variação da perda de massa de um material em função do tempo, temperatura de reação e taxa de aquecimento, permitindo a determinação de parâmetros cinéticos da decomposição térmica de sólidos, e utilizados na modelagem matemática da pirólise e/ou no projeto de equipamentos (SIMÃO *et al.*, 2018). Este método fornece, então, informações sobre os fenômenos físicos (adsorção, dessorção e transições de fase) e químicos (quimissorção e decomposição térmica) das amostras que estão sendo caracterizadas (BALAJII; NIJU, 2019).

As curvas geradas a partir da TG permitem identificar os estágios de degradação dos componentes da biomassa. Para a biomassa de microalgas, em geral, ocorre primeiramente o estágio de desidratação (de 30 a 200°C) devido a remoção da umidade da amostra, seguido do estágio da volatilização dos principais componentes voláteis como carboidratos e proteínas (entre 200 e 450°C), posteriormente, a decomposição lipídica (330 e 560°C), e por último o estágio de

volatilização do resíduo sólido (BC) que ocorre acima dos 600-650°C (SOTOUDEHNIKARANI; ALAYAT; MCDONALD, 2019; YANG *et al.*, 2019).

Em resumo, a decomposição termoquímica das biomoléculas da biomassa de microalgas começa com a decomposição de carboidratos e proteínas em temperaturas abaixo de 400°C; enquanto a decomposição dos lipídios é observada a 550°C; e o aumento da temperatura acima de 600°C, aumenta reações secundárias de craqueamento dos hidrocarbonetos de maior peso molecular (bio-óleo) em hidrocarbonetos de cadeias mais simples, ou seja, menor produção de bio-óleo e maior liberação de gás (ARAVIND *et al.*, 2020).

A decomposição dos vários biocompostos da biomassa ocorre de forma sequencial passando por compostos intermediários antes da formação dos bioprodutos finais. Dada a complexidade dos biocompostos na biomassa de microalgas, as várias possíveis vias de reações durante o processo de pirólise são sumarizadas com base no trabalho de YANG *et al.* (2019) e apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Reações e bioprodutos resultante dos processos de pirólise.

Biocomposto	Reações	Bioprodutos pirolíticos
Carboidratos (polissacarídeos e oligossacarídeos)	Hidrólise, craqueamento e desidratação	Açúcares anidros e furfurais
Açúcares	Descarboxilação e desoxigenação	Cetonas, aldeídos, ácidos e álcoois
Cetonas, aldeídos, ácidos e álcoois	Craqueamento	Olefinas
Olefinas	Ciclização	Aromáticos
Lipídios (TG)	Hidrólise e craqueamento	Ácidos graxos de cadeia longa e glicerol
Ácidos graxos	Descarboxilação, descarbonilação, desoxigenação e/ou craqueamento	Cetonas, aldeídos, ácidos, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta (olefinas)
Aminoácidos	Desaminação, metilação direta, descarboxilação, desidratação, ciclização, dimerização e homólise	Amônia, CO ₂ , aminas, nitrilas
Proteínas + Carboidratos	Reação de Maillard	Compostos de Amadori (função α - amino-carbonila), que podem reagir formando aromáticos (fenóis, piridinas, pirróis e indóis)

Fonte: Sumarizado de (YANG *et al.*, 2019).

Como visto no Quadro 2, as principais reações de decomposição de carboidratos e lipídios são vias de craqueamento, descarboxilação e desoxigenação que geram compostos intermediários como cetonas, aldeídos, ácidos, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta que podem passar por reação de ciclização formando compostos aromáticos. Além disso, proteínas e carboidratos podem se combinar por meio da reação de Maillard e formar compostos aromáticos. Enquanto que aminoácidos podem ser decompostos em amônia, CO₂, aminas e nitrilas.

A celulose é o principal constituinte da biomassa de microalgas, e a decomposição da celulose pode acontecer por dois mecanismos diferentes durante a pirólise. O mecanismo visto na pirólise lenta é a reação de fragmentação para produção de BC e produtos voláteis leves como gás de síntese, aldeídos e cetonas. Enquanto que na pirólise rápida envolve a formação de levoglucosana e outros monossacarídeos (ARAVIND *et al.*, 2020).

As evidências na literatura indicam que o maior rendimento em produção de BC ocorre a uma baixa taxa de aquecimento (pirólise lenta) e baixa temperatura de pirólise. Tendo como exemplo, a decomposição da celulose, principal constituinte da biomassa de microalgas, passa por mecanismos diferentes em pirólise lenta ou rápida. A pirólise rápida envolve a formação de levoglucosana e outros monossacarídeos, enquanto que o mecanismo visto na pirólise lenta é a reação de fragmentação e, então, a formação de BC e produtos voláteis leves como gás de síntese, aldeídos e cetonas (ARAVIND *et al.*, 2020). E como os componentes do vapor pirolítico continuam reagindo um com o outro durante o longo tempo de reação, a pirólise lenta resulta em uma grande quantidade de resíduos sólidos e baixa quantidade de produtos líquidos (bio-óleo) (YANG *et al.*, 2019).

Os rendimentos em bio-óleo obtidos (% m/m) de *Chlorella sp* (YANG *et al.*, 2014), *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* (GONG *et al.*, 2014), *Chlorella protothecoides* (PENG; WU; TU, 2000), e *Chlorella vulgaris* (ZAINAN *et al.*, 2018) foram de 35% a 425°C, 60,7% a 500°C, 64,9% a 500°C, 52% a 500°C e 19,7% a 400°C, respectivamente. Os rendimentos em bio-óleo são maiores conforme o aumento da temperatura de pirólise. Sotoudehniakarani *et al.* (2019) demonstram que, o aumento da temperatura de 450°C para 550°C, o rendimento em BC cai

cerca de 42,5% para de 32%, ao passo que o rendimento em bio-óleo aumenta de 28% para cerca de 47%.

Apesar do excelente potencial energético do bio-óleo de microalgas é necessário reduzir os teores de oxigênio e nitrogênio do bio-óleo. As vias para redução destes compostos são o hidroprocessamento com a conversão do nitrogênio em amônia via hidrogenitrogenação, e o craqueamento catalítico com a hidredesoxigenação e descarboxilação para reduzir o teor de oxigênio no bio-óleo (YANG *et al.*, 2019).

Em estudos de pirólise da biomassa de *Spirulina*, os rendimentos em BC aumentaram conforme a temperatura de pirólise diminuiu para 350°C. Os rendimentos em BC (% m/m) de *Spirulina platensis* obtidos por Jena e Das (2011) foram de 39,7% a 350°C e 25,6% a 500°C, enquanto que Yang *et al.* (2014) obtiveram cerca de 40% a 350°C e 26% a 500°C para a mesma espécie de cianobactéria. No estudo realizado por Chaiwong *et al.* (2013b) os rendimentos em BC de *Spirulina sp.* foram de 33% a 450°C e 31% a 550°C. As análises de TG aplicadas por Simão *et al.*, (2018) na biomassa de *S. maxima* mostraram que, quanto maior a taxa de aquecimento e temperatura de pirólise, maior é a taxa de perda de massa, portanto, maior formação de hidrocarbonetos aromáticos (bio-óleo) e o decréscimo na formação de BC.

Assim a baixa taxa de aquecimento e o longo tempo de reação podem resultar em maior quantidade de BC. Segundo Ronsse *et al.* (2013), o longo tempo de permanência pode resultar em mais condensação e polimerização de compostos, fato que maximiza o rendimento em resíduo sólido. Deste modo, a maximização em rendimento de BC acontece em uma faixa de temperatura de pirólise mais baixa. Como sugerem Jena e Das (2011) e Yang *et al.* (2014), a pirólise da biomassa deve ser realizada em uma faixa de temperatura próximo de 350°C para maior rendimento em BC.

3.4.1.3 Infravermelho (IR)

A análise de infravermelho (IR, do inglês *Infra Red*) é uma técnica analítica que identifica materiais orgânicos, inorgânicos e poliméricos no espectro eletromagnético do infravermelho. Este método aplica luz infravermelha para escanear as amostras e exhibe os modos de alongamento e vibração de cada grupo

químico presente nas amostras (BALAJII; NIJU, 2019). Para o BC, a técnica é utilizada para revelar as modificações do grupo funcional da superfície nas amostras nativas, e amostras ativadas ou funcionalizadas (BALAJII; NIJU, 2019). Os espectros da superfície do BC obtidos vão variar conforme a natureza da biomassa, pré-tratamento ou técnicas de ativação que são realizadas no material sólido.

3.4.1.4 Difração de Raio X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é uma técnica não destrutiva empregada para analisar materiais cristalinos. Este método utiliza um feixe monocromático de raios-X e fornece informações sobre a amostra testada, que incluem principalmente cristalinidade, tamanho médio de grão e fases, bem como, revela a natureza amorfa e cristalina de amostras de BC nativas e funcionalizadas (BALAJII; NIJU, 2019).

3.4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de MEV envolve a varredura da superfície da amostra com um feixe de elétrons para gerar imagem morfológica da amostra e são realizadas para analisar as alterações morfológicas que ocorreram após as etapas de ativação nas amostras de BC. (BALAJII; NIJU, 2019).

3.4.1.6 Composição elementar

Os resultados em composição elementar do BC de microalgas têm elevado grau de diferenciação do BC da biomassa lignocelulósica. A caracterização em BC derivado de microalgas realizada por Binda *et al.* (2020) revelou a presença de heteroátomos dopantes (elementos de dopagem de N, P, K, Mg) em concentração dez vezes maiores em comparação com biomassa lignocelulósica, bem como uma maior presença de grupos funcionais de superfície contendo oxigênio, sugerindo seu alto potencial para aplicações ambientais. A presença desses elementos pode apresentar concentrações diferentes dependendo da espécie de microalgas.

Segundo Gan *et al.* (2018), a biomassa *in natura* de microalgas não é adequada para uso como combustível sólido e muitas aplicações de engenharia por ter baixo poder calorífico, alta umidade e alta razão atômica H/C e O/C. Já o BC de microalgas normalmente têm mais nitrogênio e teor de oxigênio, bem como menor teor de carbono em comparação com BC lignocelulósico (BIRD *et al.*, 2011). Isso caracteriza uma alta razão O/C e baixa razão C/N, que estão associadas à hidrofiliabilidade e hidrofobicidade da superfície, respectivamente (LAW *et al.*, 2022). A razão molar O/C é indicativo dos grupos polares na superfície das amostras, assim, associada à hidrofiliabilidade da superfície (AMIN; CHETPATTANANONDH, 2019). A alta relação O/C contribui para uma boa adsorção de metais pesados, enquanto a baixa relação C/N favorece a adsorção de poluentes inorgânicos (AMIN; CHETPATTANANONDH, 2019).

No geral, comparativamente ao BC de biomassa lignocelulósica, os BCs derivados de microalgas são baixos em conteúdo de carbono, área de superfície e capacidade de troca catiônica, mas altos em pH, cinzas, nitrogênio e nutrientes inorgânicos extraíveis como P, K, Ca e Mg (BIRD *et al.*, 2011).

No estudo apresentado por Binda *et al.* (2020), as amostras de BC de *Spirulina sp* e *Chlorella vulgaris* mostraram composição química semelhantes (somente uma estreita diferença na concentração de Mg e K). No entanto, na amostra de BC de *Nannochloropsis sp* foi observado altas concentrações de metais alcalinos e alta quantidade de cinzas (afeta negativamente os rendimentos em BC). No mesmo estudo, a micromorfologia da amostra de BC de *Nannochloropsis sp* apresentou ser diferente das amostras do BC de *Spirulina sp* e *Chlorella vulgaris*, onde foram observados alta rugosidade superficial e grande número de sítios ativos porosos no BC da *Nannochloropsis sp.*, características interessantes para aplicações eletroquímicas e catálise, diferentemente da menor rugosidade e estrutura morfológica em forma de folha para o BC das outras duas espécies de microalgas, tornando seu BC mais atrativos para aplicações de correção de solos.

3.4.2 Ativação de BCs

Carvão ativo (CA) é o termo dado ao carvão ou BC com alta área superficial e estrutura altamente porosa. Logo, a ativação de BC (Figura 11) é um tratamento

no qual se tem modificação da superfície do BC afim de desenvolver alta porosidade e maior área superficial específica (PATRA *et al.*, 2021).

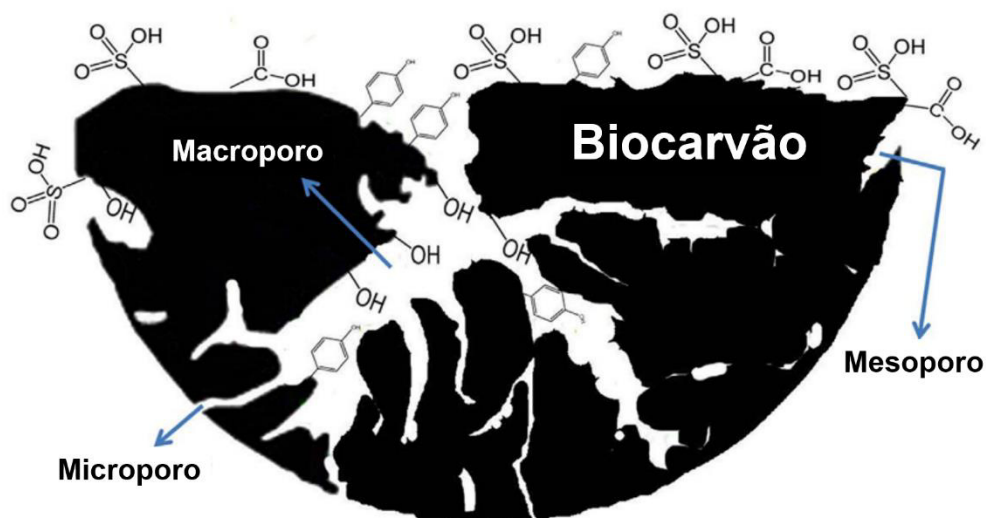
As estruturas de poros desenvolvidas na superfícies do BC (Figura 12) podem ser categorizadas como macroporos (> 25 nm), mesoporos (entre 1 nm e 25 nm), microporos (< 1 nm) (HEIDARINEJAD *et al.*, 2020). O CA pode ter uma área de superfície próxima ou superior a $1.500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, cerca de cinquenta vezes maior que a de um BC nativo (PATRA *et al.*, 2021).

Figura 11 - Mecanismo de ativação de BC: aumento de estrutura de poros e área superficial.



Fonte: Traduzido de TAN *et al.* (2017).

Figura 12 - Modelo de BC ativado poroso e grupos funcionais de superfície



Fonte: Traduzido de LEE; KIM e KWON (2017)

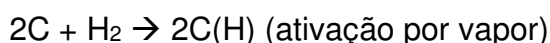
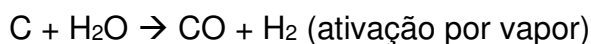
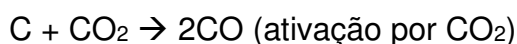
Os CAs podem ser obtidos da carbonização-ativação direta (ativação em uma etapa) ou primeiro carbonizando a biomassa e depois ativando o BC em CAs

(ativação em duas etapas) (BERGNA *et al.*, 2018). Essas modificações podem fornecer locais de contato mais disponíveis entre o BC e os adsorbatos (moléculas a serem adsorvidas na superfície), bem como formar uma estrutura de poros facilmente acessível aos adsorbatos (TAN *et al.*, 2017). Zhu *et al.* (2018) destacam que em seus experimentos a área superficial e propriedades químicas da superfície tiveram papel importante no processo de adsorção, enquanto que a boa estrutura de poros (macro, micro e mesoporos) foi o elemento indispensável para aumentar a capacidade de adsorção.

Esses processos de modificação da superfície do BC são classificados em duas categorias com base na natureza do procedimento: 1) Física e 2) Química.

3.4.2.1 Ativação física

A ativação física (ou ativação gasosa) se refere ao processo de exposição do BC ao fluxo de agentes oxidantes gasosos em altas temperaturas (ANTO *et al.*, 2021). Os agentes oxidantes comumente usados são CO₂, vapor, ar, ou mistura binária de CO₂ e N₂ (PATRA *et al.*, 2021). A ativação por ar (ou oxigênio) é um método econômico devido à demanda de temperatura de ativação relativamente menor (<500 °C) em comparação aos 800-900°C na ativação com vapor ou CO₂ que são os ativadores mais utilizados (LENG *et al.*, 2021). Segundo Leng *et al.* (2021) as principais reações ocorridas no processo de ativação são:



Em geral, a ativação física é realizada após a pirólise da biomassa. No entanto, o processo de ativação é de difícil controle devido às violentas reações exotérmicas.

3.4.2.2 Ativação química

A ativação química envolve a adição de agentes de ativação química, ou previamente no curso da carbonização da biomassa seca (ativação em uma etapa), ou adicionados ao BC formado, incluindo carbonização inicial e ativação (ativação em duas etapas) (ANTO *et al.*, 2021; HEIDARINEJAD *et al.*, 2020). A impregnação do agente de ativação química ocorre sob uma atmosfera inerte onde as temperaturas geralmente estão na faixa de 450 a 900 °C, temperaturas mais baixas do que as temperaturas necessárias para a ativação física (LENG *et al.*, 2021; PATRA *et al.*, 2021).

Em comparação com a ativação física, o BC quimicamente ativado possui maior área superficial e microporos bem desenvolvidos, porém, geralmente, possui uma densidade e rendimento mais baixos (LENG *et al.*, 2021). No entanto, a ativação química é considerada mais economicamente viável que a ativação física, pois apresenta vantagens devido a menor demanda de tempo e temperatura de processamento, CA de alta porosidade com alta formação de mesoporos (BALAJI; NIJU, 2019; BERGNA *et al.*, 2018; PATRA *et al.*, 2021).

Na ativação química vários reagentes químicos tem sido utilizados como agentes ativadores, e incluem $ZnCl_2$, H_3PO_4 , KOH , H_2SO_4 e HNO_3 (OREGE *et al.*, 2022). No entanto, KOH , $ZnCl_2$ e H_3PO_4 são os agentes químicos mais comuns de serem utilizados.

A ativação com KOH consiste na oxidação do carbono para gerar uma rede de poros (HERNANDEZ-MONTOYA; GARCA-SERVIN; BUENO-LOPEZ, 2012). A reação química durante a carbonização é incerta, porém Lillo-Ródenas *et al.*, (2003) inferem a seguinte reação química com os metais alcalinos:



Durante a reação de ativação com KOH , os elementos metálicos (K) podem entrar na estrutura de carbono e, quando são removidos durante a lavagem, as redes de carbono se mantem expandidas formando ainda mais microporos (LENG *et al.*, 2021).

Diferentemente da ação oxidativa do KOH , a ativação química por $ZnCl_2$ ou H_3PO_4 é realizada em uma etapa, pois este processo de ativação é realizada por

meio da desidratação e reações de reticulação, incluindo condensação e ciclização que são benéficas para a formação de poros (LENG *et al.*, 2021).

O ZnCl_2 é um sal com natureza ácida de Lewis e permanece em estado líquido no processo de ativação, penetrando na biomassa devido a sua dissolução na celulose e se distribui uniformemente na estrutura atuando como um esqueleto durante a carbonização, que resulta na formação de poros após a sua remoção na lavagem do BC (LENG *et al.*, 2021). Já o H_3PO_4 é o ativador ácido mais comumente utilizado e age de forma semelhante ao ZnCl_2 por meio da desidratação e reações de reticulação, onde microporos e grupos funcionais contendo P são introduzidos no BC, e ésteres de fosfato orgânicos (produtos da reação entre radical fosfato e grupo álcool de biomassa) podem proteger o esqueleto de carbono e evitar o colapso das estruturas microporosas (LENG *et al.*, 2021).

Além das reações com o material sólido, a melhora das propriedades do BC (área superficial e a porosidade) aos tratamentos com agentes químicos são atribuídos, também, a remoção de impurezas na superfície do BC pelo agente químico (TAN *et al.*, 2017).

Comumente, o ZnCl_2 gera mais área de superfície do que o H_3PO_4 , porém é menos utilizado devido as preocupações ambientais, sendo que o H_3PO_4 tem menos restrições ambientais e toxicológicas, e requer uma temperatura de ativação mais baixa que o NaOH (HEIDARINEJAD *et al.*, 2020). Segundo Tan *et al.* (2017), o tratamento com H_3PO_4 , também, pode introduzir ou aumentar o número de grupos funcionais na superfície do BC como grupos amino, carboxílicos, e grupos contendo oxigênio. Sobre outros ativadores, o autor ainda complementa que HNO_3 é mais eficaz em introduzir uma grande quantidade de grupos funcionais ácidos na superfície do BC do que o KMnO_4 , enquanto o tratamento com NaOH teve os efeitos opostos, aumentando a basicidade do BC (TAN *et al.*, 2017). Além disso, a adição de grupos N-funcionais e N-precusores orgânicos/inorgânicos (NH_4Cl , ureia, tiourea, NH_3) melhora a alcalinidade do BC (SINGH *et al.*, 2021).

As propriedades do BC ativado variam amplamente entre diferentes matérias-primas e processos de ativação, assim, os métodos de ativação se concentra principalmente em melhorar uma propriedade alvo do BC (TAN *et al.*, 2017). Logo, a seleção do agente químico aplicado na ativação é baseada na finalidade da aplicação do BC. O BC destinado a adsorver um elemento carregado negativamente é ativado com bases para que transmita carga positiva em sua

superfície, proporcionando assim forte afinidade entre adsorvente e adsorbato (ANTO *et al.*, 2021). Do mesmo modo, para o BC adsorver um elemento carregado positivamente, a ativação é feita com ácido para melhor capacidade de adsorção (ANTO *et al.*, 2021).

3.4.3 BC na remoção de Poluentes

É conhecida a existência de vários poluentes orgânicos e inorgânicos nas águas residuais resultantes das atividades industriais, agrícolas e urbanas como microplásticos, medicamentos orais, antibióticos, altas cargas de nutrientes (por exemplo, nitrogênio, fósforo), metais pesados e pesticidas, têxteis, que colocariam em risco diretamente o ecossistema aquático, bem como ameaçariam a saúde humana indiretamente (LAW *et al.*, 2022; REZA *et al.*, 2020).

Portanto, se torna cada vez mais importante o desenvolvimento de tecnologias de tratamento de águas residuais e o BC ganha significativa atenção como um adsorvente renovável de baixo custo e alta eficiência devido à sua grande atividade de adsorção que potencializa sua aplicação em várias questões ambientais, incluindo a remediação de poluentes (tanto orgânicos quanto inorgânicos) e metais pesados no solo, água, ar e outros meios gasosos, bem como o sequestro de carbono (DAI *et al.*, 2019; PATRA *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021). Em águas potáveis, o tratamento com BC é mais segura em comparação com métodos existentes (filtração de areia, fervura, desinfecção solar, cloração) por manter as propriedades organolépticas da água, enquanto os outros métodos geram subprodutos cancerígenos (por exemplo, cloração) e/ou aumentam as concentrações de contaminantes químicos (por exemplo, fervura) (GWENZI *et al.*, 2017).

A substância que tem potencial para adsorver materiais é conhecida como adsorvente e a substância que se destina à adsorção é conhecida como adsorbato/sorbato (ANTO *et al.*, 2021). Ou seja, o BC é denominado material adsorvente e os poluentes, ou materiais de interesse de adsorção, são denominados adsorbato.

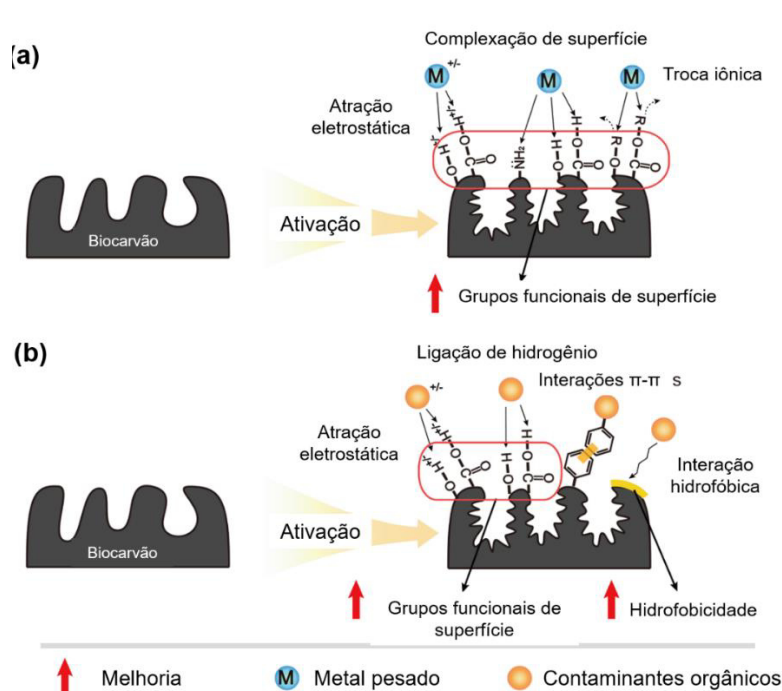
Os fatores responsáveis pela fixação adequada do adsorbato no adsorvente são a área de superfície, tamanho e volume dos poros, pH e os grupos químicos aderidos (ANTO *et al.*, 2021). A química da superfície do BC é afetada

principalmente pelo tipo da matéria-prima, pH e temperatura (DAI *et al.*, 2019). Enquanto que os fatores para o adsorbato são o tamanho para se ajustar a área de superfície do adsorvente, natureza de solubilidade e capacidade de se ligar aos grupos químicos (ANTO *et al.*, 2021).

De maneira geral, os principais mecanismos de adsorção de um BC incluem sorção física, interação eletrostática, complexação de superfície, co-precipitação, troca iônica, degradação ou oxidação e interações π - π (LAW *et al.*, 2022). Já o mecanismo de adsorção para remoção de poluentes orgânicos inclui principalmente atração eletrostática, preenchimento de poros, interação π - π doador-aceptor de elétrons, ligação H, adsorção de complexos, interações hidrofóbicas (DAI *et al.*, 2019).

A modificação das propriedades químicas da superfície do BC através da ativação (Figura 13) pode ter grande efeito na remoção de adsorbato, como grupos funcionais carboxila, hidroxila e amino pode oferecer mais sítios de ligação para metais pesados (Figura 13 A) e promover a força motriz da adsorção de metais no BC, incluindo atração eletrostática, troca iônica e complexação da superfície (TAN *et al.*, 2017).

Figura 13 - Mecanismos de adsorção para vários contaminantes: modificação das propriedades químicas da superfície do BC e seus efeitos (a) na remoção de metais pesados e (b) na remoção de contaminantes orgânicos.



Fonte: Adaptado de TAN *et al.* (2017).

Da mesma forma, o aumento da quantidade de grupos funcionais de superfície no BC pode criar sítios mais ativos para a ligação de adsorbatos orgânicos (Figura 13 B) e fortalecer as reações entre BC e adsorbatos orgânicos, como atração eletrostática e ligação de hidrogênio (TAN *et al.*, 2017). Grupos fenólicos (-OH) e amino (-NH_x) contendo elétrons desemparelhados também desempenham um papel vital na remoção de poluentes (SINGH *et al.*, 2021).

Um grande número de estudos mostrou a ótima adsorção de metais pesados, fármacos e corantes, bem como, a de possuir propriedades catalíticas ou de melhora das propriedades catalíticas do BC. Entre os vários exemplos do BC utilizado na remoção de poluentes encontrados na literatura, o BC derivado de resíduos de biomassa agrícola estudado por Chen, B., Chen, Z. e Lv (2011) foram eficazes na adsorção de naftaleno, nitrotolueno e fosfato, sendo um potencial de aplicações ambientais e agrícola. Vyavahare *et al.* (2018) obteve alta capacidade de adsorção do corante Verde Malaquita, 3000 mg.g⁻¹, pelo BC derivado de bagaço de cana de açúcar. Já o BC derivado de fibra de palma estudado por Zhou *et al.* (2019) teve capacidade de adsorção do metilparabeno, um conservante de cosméticos e fármacos, de 349,7 mg.g⁻¹. Enquanto que o BC derivado da casca de pomelo idealizado por Tran *et al.* (2020) apresentou capacidade de adsorção de paracetamol de 147 mg.g⁻¹.

Poo *et al.* (2018) avaliaram a capacidade de adsorção de metais pesados pelo BC derivado das macroalgas *Saccharina japonica* e *Sargassum fusiforme* obtendo capacidades de adsorção de cobre (II) de 98,6 mg.g⁻¹ e 94,1 mg.g⁻¹, de cádmium (II) de 60,7 mg.g⁻¹ e 37,2 mg.g⁻¹, e de zinco (II) de 84,3 mg.g⁻¹ e 43 mg.g⁻¹, respectivamente.

Peng *et al.* (2014) aplicaram o BC derivado de microalgas com sucesso na remoção de poluentes como a remoção de tetraciclina de sistemas aquosos com capacidade de adsorção de 95,86 mg.g⁻¹. O BC derivado do resíduo de *Spirulina* (pós extração de ficocianina) produzido por Ge *et al.* (2020) exibiu adsorção satisfatória de mercúrio (II) com máxima capacidade de 196,1 mg.g⁻¹. Zheng *et al.* (2017) utilizaram o BC derivado da *Chlorella sp.* na adsorção de p-nitrofenóis e obteve capacidade de adsorção de 204,8 mg.g⁻¹ e atribuiu a capacidade de adsorção superior à forte polaridade dos sítios ativos do BC. Em condições específicas de pH, Amin e Chetpattananondh (2019) alcançaram uma alta eficiência

na adsorção de cromo (VI), zinco (II) e níquel (II) utilizando o BC derivado da biomassa residual da extração de óleo da microalga *Chlorella sp.* As capacidades de adsorção foram $18,86 \text{ mg.g}^{-1}$, $21,31 \text{ mg.g}^{-1}$ e $27,45 \text{ mg.g}^{-1}$ para cromo (VI), zinco (II) e níquel (II), respectivamente. Exemplos assim, demonstram o forte potencial do uso do BC de microalgas no tratamento de águas residuais ou no controle emergencial da poluição de água.

Heidarinejad *et al.* (2020) ressaltam as vantagens do BC ativado, em comparação às zeólitas ou adsorventes poliméricos, como: alta qualidade no tratamento de efluentes, projetos de processo simples, fácil exploração do processo, resistência a ambientes corrosivos e tóxicos, alto potencial na purificação de gases e líquidos e seu uso como suporte para catalisadores. E dada a sua ampla gama de aplicações, o uso do BC é considerado um cenário vantajoso tanto para a gestão de resíduos quanto para a remediação ambiental (PATRA *et al.*, 2021).

3.4.4 BC como suporte catalítico

As aplicações dos BC, em especial BC de microalgas, são vastas, mas a atividade catalítica para a produção de biocombustíveis utilizando o BC de microalgas tem ganhado importância nesse campo de pesquisa (ANTO *et al.*, 2021). Foi visto que o BC é facilmente funcionalizado e pode adquirir sítios catalíticos ácidos ou básicos (ativação química), e/ou adsorver compostos catalíticos (impregnação). Fu *et al.* (2013), por exemplo, relatam que a celulose é o principal componente do resíduo da biomassa de microalgas após a extração do óleo, portanto, uma estrutura sólida de carbono com alta densidade de grupo funcionais podem ser obtidos na conversão termoquímica. Assim, um catalisador sólido ácido a base de BC pode ser efetivamente preparado a partir de resíduos de microalgas. Logo, o BC é um material que permite a sua utilização como suporte catalítico com propriedades particulares como a resistência térmica, estabilidade em meios básicos ou ácidos, e a fácil adsorção de metais.

O emprego do BC como catalisador ou suporte heterogêneo, ou seja, catalisador baseado em carbono (carvão ou BC), em reações de TEIS da biomassa de microalgas é eventualmente mencionado na literatura, porém, estes são considerados ideais devido as características desejáveis para um suporte catalítico, incluindo o custo mais baixo de matéria-prima (fontes renováveis), alta área de

superfície, estabilidade térmica e adaptação de grupo funcionais, tornando-o ideal para a produção de biodiesel, por exemplo (CHI *et al.*, 2021; KONWAR; BORO; DEKA, 2014)

O BC feito a partir de microalgas normalmente têm área superficial menor do que o BC de biomassa lignocelulósica, mas pode ser melhorado aumentando a temperatura da conversão termoquímica (LAW *et al.*, 2022). Ademais, as microalgas são renováveis e cultiváveis em grande parte da natureza e fáceis de converter em BC em curto período de tempo e baixa temperatura devido à ausência de lignina na sua biomassa (ANTO *et al.*, 2021).

Em aplicações do BC como catalisador heterogêneo, o máximo rendimento de biodiesel foi sensível ao teor de lignina da biomassa fonte de BC, mas não mostrou-se sensível ao teor de celulose e hemicelulose (LEE *et al.*, 2017). Isso garante uma grande vantagem ao BC de microalgas como um catalisador heterogêneo em potencial para ser usado para reduzir o preço do biodiesel, fazendo-o competir com o diesel derivado do petróleo (ANTO *et al.*, 2021).

Assim, o BC mantém vantagem elevada em comparação com outros catalisadores de base sólida comercialmente disponíveis devido ao seu: i) baixo custo ii) ecologicamente correto iii) processos de produção fáceis, iv) reutilização e v) biodegradabilidade, sendo, então, chamados de catalisadores verdes, também devido à disponibilidade sustentável de matéria-prima (CHI *et al.*, 2021).

Embora muitas pesquisas tem se concentrado nos diferentes aspectos da aplicação do BC, seu uso como catalisador, em específico o BC de microalgas, tem sido pouco estudado (CHI *et al.*, 2021). Portanto, o estudo sistemático abre caminho para o emprego de BC derivado de microalgas em campos de aplicação até agora inexplorados (BINDA *et al.*, 2020), sendo essencial investigação em larga escala para entender seu potencial em viabilidade a longo prazo e viabilidade econômica (CHI *et al.*, 2021).

Poucos artigos de pesquisa são relacionados à produção de biodiesel utilizando BC de microalgas como catalisadores para o processo de esterificação e TE (ANTO *et al.*, 2021). A impregnação por compostos catalíticos, em específico o BC da biomassa de *S. maxima*, e a sua aplicação como catalisador na reação de TEIS ainda não foram explorados e merecem estudos específicos para este fim.

3.5 Reação de transesterificação *in situ* (TEIS)

Como visto no capítulo 3.2.1, o biodiesel (ésteres alquílicos de ácidos graxos) é produzido pela reação de TE e esterificação de óleos por catálise ácida ou básica. Para isso, o processo de produção de biodiesel envolve a extração dos lipídios da biomassa, e posterior conversão do óleo extraído em biodiesel. Esse processo pode ser denominado processo em duas etapas: extração seguida de conversão.

Para o alto rendimento de produção de biodiesel de microalgas, a demanda primária de energia são decorrentes de colheita e pré-tratamentos como desidratação, secagem, extração de lipídios, conversão e purificação, no entanto, essa demanda torna o processo economicamente pouco atraente (KIM *et al.*, 2022; KUMAR; SINGH, 2019). Estima-se que somente o processo de extração e purificação impacta em 70 a 80% no custo de produção do biodiesel de microalgas (GO *et al.*, 2016).

A extração convencional de óleo de microalgas aplica a destruição físico-química da biomassa de células secas antes da conversão (LOH *et al.*, 2021). Apesar de existirem pré-tratamentos que melhoram a capacidade de extração de lipídios intracelulares como: moagem por esferas, homogeneização de alta pressão, hidrólise enzimática, estresse térmico, osmose reversa em autoclave e desidratação por pressão osmótica em suspensão em etanol (BANERJEE *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2019; NITSOS *et al.*, 2020), esses processos de extração necessitam de muito tempo, energia, água e produtos químicos (ZORN *et al.*, 2022b).

Por isso tem havido um aumento no interesse em se processar a biomassa da microalga com reação de transesterificação de maneira *in situ* (TEIS), ou seja, realizar a extração dos lipídios e a reação de transesterificação/esterificação de maneira concomitante, em uma única etapa do processo.

A principal vantagem do processo de TEIS é eliminar a certas etapas de downstream como pré-tratamento e extração de óleo da biomassa, minimizando o consumo elevado de solventes e tempo operacional (KIM *et al.*, 2019; LEWIS; NICHOLS; MCMEEKIN, 2000). A eliminação da etapa de extração de lipídios também resulta em menor custo de investimento inicial, de instalação de equipamentos e manutenção, e consumo de energia (KIM *et al.*, 2019;

SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; GUMBYTE, 2016). Além disso, em comparação com a TE convencional em duas etapas, a TEIS realizada por Loh *et al.* (2021) demonstrou um aumento na recuperação de ésteres de 36,4% e 53,0%, respectivamente para as cepas de *C. vulgaris* e *M. gracile*.

Ao se processar a TEIS com biomassa seca, Ehimen *et al.* (2010) investigaram isoladamente os parâmetros de volume de álcool vs temperatura, tempo de reação, agitação e umidade. Desta maneira, os melhores resultados atingiram uma conversão de lipídios de 92% utilizando 4 mL de metanol e 0,15 mL de H₂SO₄ a 90°C em 1 h de reação. Lemões (2011) demonstra que o rendimento utilizando a rota metílica ou etílica na conversão direta de lipídios não variou significativamente, atingindo conversões próximas a 98%. Utilizando HCl como catalisador da TEIS da biomassa seca, Ghosh *et al.* (2017) obtiveram uma conversão de 95% dos lipídios realizando a reação com 5 mL de metanol e catalisador a 4 mol.L⁻¹ em 7 h de reação a 65°C. Branco *et al.* (2020) realizaram a TEIS da biomassa seca assistida por ultrassom com 4 mL de etanol, 0,5 mL de HCl e 6 mL de hexano, e obtiveram 95,65% de conversão em 120 min de reação a 60°C.

Estequiométricamente, a formação do biodiesel na TE ocorre em uma razão molar estequiométrica de 3:1 para álcool:triglicerídeo. No entanto, a TEIS é processada com excesso do álcool em cerca de 10.000 mol de álcool por mol de lipídios esterificáveis (NGUYEN *et al.*, 2020). A alta razão molar aumenta o contato entre o álcool e o triglicerídeo, logo, desloca o equilíbrio favorecendo a formação de mais produtos, no entanto, uma diminuição da taxa de recuperação pode ser observada devido à má separação do glicerol (OREGE *et al.*, 2022). O álcool além de atuar como reagente (acceptor acil), também, atua como solvente do processo de TEIS (PEDRO *et al.*, 2021). Assim, o limiar é essencial para evitar a diluição da concentração do catalisador e a desativação do sítio ativo que pode levar a um baixo rendimento de biodiesel (OREGE *et al.*, 2022).

No modelo fenomenológico apresentado por Branco *et al.* (2020), os valores de coeficiente de massa sugerem que o álcool se move na fase sólida (biomassa) com taxa de convecção menor que a dos ácidos graxos se difundem para o meio reacional, garantindo maior disponibilidade lipídica na primeira metade da reação. Os autores ainda verificaram que a produção de ésteres é maior no período inicial da reação devido a essa maior disponibilidade de lipídios, onde 75%

do rendimento de conversão é alcançado nos primeiros 60 min de reação, tendendo a atingir um máximo de conversão ao longo do tempo (platô). Nguyen *et al.* (2021) também relatam que o rendimento em ésteres aumenta ao longo da TE, no entanto, um platô é alcançado após um certo período de tempo.

Inicialmente, a umidade da biomassa foi relatada como parâmetro de inibição da TEIS, tendo a reação completamente inibida em umidade superior a 32% em processos com baixa razão álcool/biomassa e sem a utilização de co-solventes (EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010). Kim *et al.* (2019) apontam que a inibição da TEIS pela umidade é resultado da formação de aglomerados de prótons ao redor do catalisador, onde esse excesso de carga no catalisador é desfavorável (LEE *et al.*, 2022).

No entanto, a TEIS de biomassa de microalgas úmida é um dos métodos emergentes para produzir biodiesel, pois esta abordagem, além da extração de lipídios, também exclui etapa de uso intensivo de energia da secagem através da fusão do processo (NGUYEN *et al.*, 2021). Assim, o desenvolvimento de pesquisas tecnológicas que melhore o balanço energético do biodiesel microalgal, como pesquisas de TEIS de biomassa úmida, merece uma análise mais concentrada.

Da literatura, Kim *et al.* (2015) utilizaram o HCl como catalisador na rota metílica da TEIS com biomassa contendo 80% de umidade e obtiveram um rendimento de 90%. Por sua vez, Suh *et al.* (2015) avaliaram o pré-tratamento com álcool a partir de amostra com 80% de umidade resultando em 70% de conversão em apenas 30 min de reação para a microalga *Ettlia sp.* Salam *et al.* (2016) utilizaram dodecil sulfato de sódio (DSS) e H₂SO₄ no meio reacional e atingiram um rendimento em biodiesel de 98,3% com uma biomassa com 20% de umidade.

Macías-Sánchez *et al.* (2018) utilizaram a metodologia de superfície de resposta na TEIS metílica em uma amostra com 81,1% de umidade. Os autores relatam que a otimização converteu 100% dos AGL em 105 min de reação a 100°C (254 mL de metanol e 3,7% v/v de H₂SO₄) com um rendimento de 78,7% em ésteres metílicos.

Sung e Han (2018) obtiveram 94,6% de conversão na rota etílica da TEIS com biomassa de *Aurantiochytrium sp.* com 40% de umidade em 30 min de reação a 70°C. Os autores processaram a TEIS úmida no ultrassom utilizando o álcali K₂CO₃ como catalisador (3% m/v catalisador:etanol, 10:1 razão etanol:biomassa)

sem incidência da saponificação. Segundo os autores, a escolha do etanol e ultrassom foram capazes de reprimir a saponificação.

Com umidade de 75% da biomassa e rendimento de conversão de 96%, Nguyen *et al.* (2020) demonstraram que o aumento da concentração de metanol resultou em uma melhoria mais significativa em ésteres em comparação com a concentração de H₂SO₄. Os autores defendem que o efeito sinérgico do co-solvente na extração dos lipídios e o aumento da solubilidade entre a fase lipídica e metanol acelera a reação de TEIS ao utilizar a biomassa úmida. Por fim, os autores afirmam que a adição do co-solvente tem como objetivo aumentar a solubilidade do lipídio (não polar) na fase álcool (polar) e co-solventes com índice de polaridade de faixa média foram ideias para alto rendimento de ésteres em TEIS, como n-butanol ou THF.

Do estudo anterior, Pedro *et al.* (2021) maximizaram o rendimento em massa e a conversão da reação de TEIS com biomassa úmida (84%) da microalga *Chlorella minutissima*. O estudo efetuado com biomassa úmida atingiu ganhos percentuais de extração de 30 a 40% em massa, com médias de 84% a 98,4% de conversão, resultado competitivo ao processo tradicional de duas etapas. Embora a umidade tenha afetado negativamente a conversão lipídica em ésteres etílicos, foi observado que a presença de água no meio, potencialmente, promove o inchaço das paredes celulares das microalgas facilitando a transferência de massa dos reagentes.

Segundo Cohen (1999), existe um efeito de inchamento das células na biomassa úmida que facilita o acesso dos reagentes ao interior da célula, bem como a dissolução dos lipídios no meio reacional. Pode se inferir, então, que a permeabilidade da parede celular é aumentada com o aumento da umidade da biomassa devido ao comportamento hidrofílico dos polissacarídeos da parede celular da microalga (PEDRO *et al.*, 2021). Logo, a umidade na biomassa, em níveis adequados, pode favorecer o mecanismo da reação *in situ* ao ponto de dissolver no álcool e não interferir na reação de TEIS. Lee *et al.* (2022) demonstram que, em certas condições reacionais, a água promove a hidrólise dos TG aumentando a formação de ésteres de ácido graxo.

Para Orege *et al.* (2022), existem uma relação direta entre temperatura e rendimento de ésteres. Os autores afirmam que a resistência à transferência de massa em alta temperatura é reduzida entre o reagente e o catalisador, o que

resulta em alta conversão dos lipídios. No entanto, Kim *et al.* (2019) atentam para que a TEIS úmida tende a ter características distintas dependendo da temperatura de reação aplicada e do incremento na temperatura da reação, e pode compensar, ou não, a inibição causada pela água.

Assim, Kim *et al.* (2019) classificam a TEIS úmida pela temperatura de reação: baixa temperatura (abaixo de 100°C), média temperatura (entre 101-200°C) e alta temperatura (acima de 200°C), e discorre que cada classificação de temperatura fornece características distintas do processo de TEIS úmida, independentemente das espécies de microalgas e variação de umidade.

Nguyen *et al.* (2021) comparam a TEIS de biomassa de microalgas úmida (75% de umidade) e seca em baixa temperatura (a 60°C). A TEIS de biomassa seca atingiu o platô de conversão em 45 min, enquanto que a TEIS de biomassa úmida atingiu o platô em 35 min (conversão de 95,5% m/m), ou seja, a TEIS úmida ocorreu a uma taxa muito mais rápida do que a TEIS seca, negligenciando o efeito de diluição do excesso de água (75% em peso de teor de umidade).

Nguyen *et al.* (2021) também observaram que o aumento de temperatura de 50°C para 60°C reduziu o tempo em aproximadamente 10 min para atingir o platô de reação. Esse efeito é relacionado diretamente a natureza endotérmica da TEIS (ΔH positivo). Pelo princípio de Le Chatelier, a alta temperatura na reação de TEIS endotérmica favorecerá a formação de produtos para atingir o equilíbrio químico (LEE *et al.*, 2022). Assim, a conversão será aumentada com a temperatura devido a frequência de colisão promovida entre as partículas reagentes (LEE *et al.*, 2022), bem como, o aumento da frequência da colisão entre os reagentes por conta da maior razão molar de álcool e catalisador para lipídios que é praticado em TEIS úmidas (NGUYEN *et al.*, 2021).

Nguyen *et al.* (2021) asseguram que o ΔH tem correlação com a razão molar álcool/lipídios, de modo que, o aumento de álcool reduz o ΔH provavelmente devido à entalpia de mistura (calor liberado) entre o álcool e a água durante a TEIS de biomassa úmida. Logo, a TE de matérias-primas secas requer maior aporte de energia devido à ausência de entalpia de mistura entre o álcool e água.

Kim *et al.* (2019) certificam que a TEIS de biomassa úmida conduzida na zona de temperatura média (100°C < temperatura < 200°C) tem a vantagem de reduzir o consumo de álcool, catalisador e co-solvente, pois o aumento da temperatura compensa o impedimento da reação pela água. Os autores ainda

complementam que alguns estudos de TEIS úmida conduzidos com co-solvente em temperatura média produziram produtos químicos. Utilizando clorofórmio-etanol-H₂SO₄, eles apresentam que, além da alta conversão, uma quantidade significativa de coprodutos como levulinato de etila, formiato de etila e éter dietílico, foram produzidos devido ao efeito da temperatura na hidrólise da celulose.

Já em altas temperaturas, Kim *et al.* (2019) sustentam que a presença da água (oriunda da umidade) torna a reação de TEIS mais simples pois, com o estado subcrítico da água e do álcool, que alteram suas características, a água subcrítica hidrolisa o co-solvente, o que permite tornar o meio reacional ácido o suficiente para atingir potencial de conversão de lipídios em ésteres.

Em geral, emprega-se o uso de co-solvente nas reações de TEIS para aumentar a ruptura da parede celular, reduzindo a relação solvente/biomassa, ou seja, minimizando a quantidade de álcool no sistema e aumentando a transferência de massa (solubilidade) entre o óleo e os reagentes, além de permitir uma melhor separação do biodiesel onde o catalisador e o álcool ficam contidos na fase aquosa (KIM *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2022). Além disso, o efeito do co-solvente pode ser potencializado com o aumento da temperatura de reação devido à viscosidade reduzida no meio reacional (NGUYEN *et al.*, 2021). Essa redução do consumo de reagentes, por conta do estado subcrítico, pode compensar o maior gasto energético necessário para atingir a temperatura operacional. Sendo assim, a TEIS de biomassa úmida em altas temperaturas configura um processo promissor e vantajoso.

A técnica de TEIS assistida em ultrassom aumenta a capacidade de extração dos lipídios, no entanto, o lipídio pode ser oxidado durante o processo e, além disso, a técnica é restrita a espécies como *Chlorella sp.* que possuem parede celular rígida, pois, em espécies com paredes celular flexível, como *Tetraselmis suecica* e *Nannochloropsis sp.*, a parede tende a se enrolar e preservar o lipídio dentro da membrana (LEE *et al.*, 2022).

Mesmo o processo de TEIS apresentando resultados competitivos em relação ao processo em duas etapas, realizar a TEIS da biomassa necessita de algumas etapas de processamento consideradas como desvantajosas por demandar maior quantidades de solventes e co-solventes, e alta demanda energética (KIM *et al.*, 2019), incluindo, por exemplo: grande volume de álcool que deve ser recuperado e a dificuldade de recuperação do ácido (catalisador

homogêneo) solubilizado no álcool. No entanto, é visto que ao elevar a temperatura de reação da TEIS de biomassa úmida para entre 100 e 200°C, a quantidade de solventes e co-solventes podem ser reduzidas em comparação com a TEIS úmida abaixo de 100°C.

Porém, a recuperação do ácido catalisador homogêneo ainda permanece problemático. Além de ser um meio altamente corrosivo, a remoção do catalisador na TE por catálise homogênea é realizada pela lavagem sucessiva com água, gerando grande volume de águas residuárias (FANG; SMITH; LI, 2017; JANAUN; ELLIS, 2010; KONWAR; BORO; DEKA, 2014). O catalisador homogêneo não é prontamente reutilizado (FANG; SMITH; LI, 2017) ou, muitas vezes, não são reutilizados e resultam na produção de "lixo químico" (KONWAR; BORO; DEKA, 2014).

Pesquisadores vêm dedicando intensa pesquisa visando a otimização das quantidades de álcool e/ou co-solventes utilizados no processo *in situ* (HIDALGO *et al.*, 2015a, 2015b; KARIMI, 2017). Ainda assim, a TEIS deve ser longa o suficiente para a extração de lipídios e conversão em ésteres. No entanto, as pesquisas de otimização do tempo de reação da TEIS pelos tipos catalisadores ainda não foram esgotadas, como estudos de TEIS úmida com catalisadores heterogêneos.

Fora do contexto de TEIS, vários estudos demonstram sucesso na utilização de catalisadores heterogêneos nas reações de TE de óleos vegetais ou microbianos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2017; GULDHE *et al.*, 2017a, 2017b; LOURES *et al.*, 2018) e de como a sua utilização pode ser vantajosa na produção do biodiesel de microalgas (SANI; DAUD; ABDUL AZIZ, 2013).

3.6 Catalisadores heterogêneos na reação de TEIS

Como Orege *et al.* (2022) listam, teor de água, ácido graxo livre, quantidade de catalisador, proporção de álcool para TG, temperatura e tempo de reação e pressão de reação, são os fatores que afetam a taxa de conversão do óleo em biodiesel. No entanto, as características do catalisador também têm grande relevância no rendimento da conversão.

O catalisador utilizado em reações de TE pode ser categorizado em catalisador homogêneo, catalisador heterogêneo, nanocatalisador e biocatalisador

(enzima) (LEE *et al.*, 2022). Em especial para a catálise heterogênea, acidez, basicidade, hidrofobicidade, hidrofobicidade e/ou porosidade do catalisador heterogêneo afetam significativamente a reação de TE, onde o rendimento da reação de TE vai depender em grande parte da combinação eficiente e ótima dos parâmetros (OREGE *et al.*, 2022). Dentre os catalisadores homogêneos e heterogêneos, esses podem ser ainda classificados como catalisadores básicos e ácidos.

O uso de catalisadores ácido homogêneo na reação de TEIS, como H_2SO_4 , além da corrosão nos equipamentos do processo e não reutilização após a reação, causam problemas de separação posteriormente ao término da reação, o que necessitaria alto consumo de energia e geraria grande quantidade de água residual durante a purificação do biodiesel (TANG *et al.*, 2020). Além da não recuperação do catalisador homogêneo, o ácido é promotor da solubilidade parcial do glicerol produzido na fase éster imiscível, dificultando a purificação dos ésteres que requer a neutralização e lavagem com água, resultando em grandes quantidades de efluentes que requerem tratamento para serem reutilizados ou devidamente descartados (ROCHA; OLIVEIRA; FRANCA, 2019).

Em contrapartida, o uso de catalisador heterogêneo é considerado um processo mais verde do que o uso de catalisador homogêneo. Como os catalisadores sólidos podem ser facilmente separados dos reagentes e reutilizáveis, a geração de efluentes pode ser evitada (KIM *et al.*, 2022) e também a perda de catalisador e o custo variável do material pode ser minimizada (LEE *et al.*, 2022).

O emprego de catalisadores heterogêneos na produção de biodiesel de biomassa vegetal vem ganhando grande atenção nos últimos anos devido à sua facilidade recuperação na mistura reacional, maior reutilização do catalisador e redução da corrosão do equipamento, pois reduz em certa medida o custo de produção do biodiesel, aumentando significativamente a viabilidade econômica do processo (BALAJII; NIJU, 2019; OREGÉ *et al.*, 2022).

Apesar do catalisador heterogêneo ter maior limitação de transferência de massa entre reagente e catalisador, isso pode ser superado com a elevação da temperatura de reação que aumenta a miscibilidade por consequência (LEE *et al.*, 2022).

Neste contexto, apesar da desvantagem de exigir condições de reação drásticas (temperaturas e pressões elevadas, tempos de reação mais longos) (ROCHA; OLIVEIRA; FRANCA, 2019), a aplicação de catalisador ácido heterogêneo que seja facilmente separável, não corrosivo, reutilizável, que facilite a purificação dos ésteres e não tóxico na produção de biodiesel merece ser investigada para solucionar tais obstáculos que aumentam os custos de produção (TANG *et al.*, 2020).

Além da simplificação das etapas de separação e reutilização, os catalisadores heterogêneos de caráter ácido são indiferentes a presença de AGL e teor de água, e catalisam simultaneamente as reações de esterificação e TE, e podem ser aplicados em reatores de fluxo contínuo (FANG; SMITH; LI, 2017). Para Banerjee *et al.* (2019), em comparação com o processo de produção convencional de biodiesel, o uso de biomassa úmida e catalisador heterogêneo aplicados na reação de TEIS mostram-se com menor pegada ambiental a partir da análise de ciclo de vida. Em vista do importante papel na simplificação de etapas na produção do biodiesel, a utilização de catalisadores heterogêneos no processo *in situ* oferece a facilidade da separação e recuperação do catalisador que poderia ser reutilizado em uma nova batelada.

Consequentemente, a utilização do catalisador sólido traria economia de recursos e energia, reduzindo o custo global, viabilizando ainda mais a TEIS da biomassa de microalgas. Tal processamento, TEIS biomassa de microbiana com catálise heterogênea, ainda são incomuns de serem relatados na literatura. O Quadro 3 apresenta as condições dos trabalhos de catálise heterogênea até então publicados e disponíveis na literatura, mostrando, portanto, o potencial pouco explorado na reação de TEIS por catálise heterogênea.

Pelo Quadro 3, é notória a utilização de alumina (Al_2O_3) como o suporte catalítico mais comumente utilizado. KOH e o HPA de Mo ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) foram eficientemente impregnados em alumina por Ma *et al.* (2015) e Zorn *et al.* (2020), respectivamente, resultando em conversões acima de 90% em TEIS da biomassa de microalgas. Alumina magnetizada ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$) também foram aplicadas com eficácia como suporte para KOH por Kazemifard *et al.* (2019) atingindo a conversão em ésteres acima de 95% na TEIS de biomassa de cultura mista de microalgas. Outro suporte semelhante a alumina, óxido de nióbio (Nb_2O_5), também atuou eficazmente como suporte para o HPA de Mo ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) no estudo de Zorn *et*

al. (2022) da TEIS da biomassa seca de *Dunaliella salina*, alcançando 92,9% de conversão dos lipídios.

Lipase, resina de troca iônica, óxidos como SrTiO₃ e óxidos mediados por PEG (polietilenoglicol), também já foram reportados como catalisadores heterogêneos em reações de TEIS da biomassa de microalgas (AGHILINATEGH; BARATI; HAMADANIAN, 2020; JO; LEE, O. K.; LEE, E. Y., 2014; QU *et al.*, 2021; VICENTE *et al.*, 2017).

Anto *et al.* (2019) executaram a impregnação de nanopartículas de ferro bioderivadas (moringa oleífera) em BC derivado de folhas de plantas (goiabas, eucalipto e manga) e empregou-o como catalisador heterogêneo na TEIS de duas microalgas marrons marinhas (*Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis sp.*). Os autores não apresentam o percentual de conversão, somente o percentual de recuperação individual de alguns ácidos graxos, porém, os autores afirmam que ambos catalisadores mostraram conversão eficientes de lipídios em ésteres de ácido graxos para as duas microalgas.

Constata-se do Quadro 3 que apenas a TEIS realizada por Zorn *et al.* (2020) utiliza a biomassa úmida (com 15% de umidade), evidenciando a falta de literatura de TEIS heterogênea com a biomassa úmida. Ainda assim, a biomassa com 15% de umidade utilizada por Zorn *et al.* (2020) pode ser considerada como baixa umidade, porém, mostra o caminho para o uso de catalisadores heterogêneos na TEIS de biomassa úmida de microalgas.

Também nota-se no Quadro 3 que, excluindo o estudo realizado por Li *et al.* (2011), os autores empregaram o catalisador heterogêneo disperso junto à biomassa de microalgas no meio reacional, o que não possibilita a recuperação do catalisador ao término da batelada. Assim, a biomassa, tida como subproduto do processamento *in situ*, contém frações de carboidratos (que podem ser convertidos em bioetanol) e proteínas (que podem ser convertidas em BC), e estaria agregada ao catalisador levando a perda de ambos pela difícil separação dos dois componentes.

Quadro 3 - Publicações de TEIS por catálise heterogênea aplicadas em biomassa microalgal

Referência	Microalga	Umidade da BM	Catalisador	Reator	Aceptor Acil	Co-solvente	Condições de reação	Conversão
(LI <i>et al.</i> , 2011)	<i>Nannochloropsis sp.</i>	0%	Mg–Zr	Extrator Soxhlet	Metanol	Diclorometano (DCM)	45 mL (metanol/DCM) = 3:1), cat. 10%, 65°C, 4h	28%
(JO; LEE; LEE, 2014)	<i>Chlorella sp.</i>	0.5%	Lipase	Tubo Falcon	DMC	-	10:1 razão DMC/BM (v/m), cat. 20% (m/m BM), 70°C, 24 h	367,31 mg FAME.g ⁻¹
(MA <i>et al.</i> , 2015)	<i>Chlorella vulgaris</i>	0%	KOH/Al ₂ O ₃	Balão de vidro	Metanol	-	8:1 razão metanol/BM (v/m), cat. 10%, 60°C, 5 h	89,53%
(VICENTE <i>et al.</i> , 2017)	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	0%	Resina de troca iônica CT-269	Balão de vidro	Metanol	-	33:1 razão metanol/BM, cat. 52% (m/m BM), 95°C, 4 h	76,50%
(DE LUNA <i>et al.</i> , 2017)	<i>Chlorella sp.</i>	0%	LiOH/pedra pome	Balão de vidro	Metanol	Hexano	12:1 razão metanol/BM, 1:1 hexano/metanol (v/v), cat. 20% (m/m BM), 80°C, 3 h	47%
(ANTO <i>et al.</i> , 2019)	<i>Isochrysis sp e Phaeodactylum tricornutum</i> Cultura mista (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus bijuga</i> , <i>Euglena sp.</i> , <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> , <i>microcystis aeruginosa</i> e <i>Chlamydomonas debaryana</i>)	não informada	Nanopartícula de Fe (bio-derivado) em BC de folhas	não informado	Metanol	-	166:1 razão metanol/BM, cat. 9% (m/m BM), 80°C, 4 h	- *
(KAZEMIFARD <i>et al.</i> , 2019)	<i>Isochrysis sp e Phaeodactylum tricornutum</i> Cultura mista (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus bijuga</i> , <i>Euglena sp.</i> , <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> , <i>microcystis aeruginosa</i> e <i>Chlamydomonas debaryana</i>)	0%	KOH/Fe ₃ O ₄ -Al ₂ O ₃ nano-magnético	Balão de vidro	metanol	-	12:1 razão metanol/BM, cat. 4% (m/m BM), 65°C, 6 h	95,60%

(continua)

(conclusão)

Quadro 3 - Publicações de TEIS por catálise heterogênea aplicadas em biomassa microalgal

Referência	Microalga	Umidade da BM	Catalisador	Reator	Aceptor Acil	Co-solvente	Condições de reação	Conversão
(ZORN <i>et al.</i> , 2020)	<i>Chlorella minutissima</i>	15%	H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀ /Al ₂ O ₃	Reator de aço inoxidável pressurizado (tipo PARR)	etanol	-	120:1 razão etanol/óleo (molar), cat. 20% (m/m óleo), 200°C, 6h	96,6
(ZORN <i>et al.</i> , 2020)	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	15%	H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀ /Al ₂ O ₃	Reator de aço inoxidável pressurizado (tipo PARR)	etanol	-	120:1 razão etanol/óleo (molar), cat. 20% (m/m óleo), 200°C, 6h	96,9
(AGHILINATEGH; BARATI; HAMADANIAN, 2020)	<i>Chlorella vulgaris</i>	0%	SrTiO ₃ nanocatalisador	Reator de aço inoxidável pressurizado (tipo PARR)	metanol	hexano	24:1 razão metanol/BM (v/m), 1:9 hexano/metanol (v/v), cat. 6g.g ⁻¹ BM, 270°C a 10MPa, 1h	16,65 mg FAME.g ⁻¹
(QU <i>et al.</i> , 2021)	<i>Spirulina platensis</i>	0%	PEG/MgO/Z@Fe ₃ O ₄	Micro-ondas	etanol	-	8:1 razão etanol/BM, cat. 2% (m/m BM), 70°C, 50 min	95,8
(QU <i>et al.</i> , 2021)	<i>Spirulina platensis</i>	0%	PEG/MgO/ZSM-5@Fe ₃ O ₄ magnético	Micro-ondas	etanol	-	8:1 razão etanol/BM, cat. 2% (m/m BM), 70°C, 40 min	95,8
(ZORN <i>et al.</i> , 2022b)	<i>Dunaliella salina</i>	0%	H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀ /Nb ₂ O ₅	Reator de aço inoxidável pressurizado (tipo PARR)	etanol	hexano	180:1 razão etanol/óleo (molar), 40% hexano (v/v), cat. 10% (m/m óleo), 250°C, 6h	92,94
(ZORN <i>et al.</i> , 2022b)	<i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Mucor circinelloides</i> (consórcio)	0%	H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀ /Nb ₂ O ₅	Reator de aço inoxidável pressurizado (tipo PARR)	óleo fúsel sintético	hexano	180:1 razão óleo fúsel/óleo (molar), 40% hexano (v/v), cat. 10% (m/m óleo), 250°C, 6h	96.80**

Legendas: BM = biomassa, cat. = catalisador, DMC – dimetilcarbonato; * não apresenta conversão, apenas %recuperação de FAME específicos; ** biolubrificantes.

Fonte: Próprio autor

Outros compostos sólidos já foram explorados como catalisadores na conversão de óleos vegetais em biodiesel. Como afirmam Cordeiro *et al.*, (2011), a atuação catalítica destes compostos sólidos dependerá da natureza dos sítios catalíticos de Lewis ou de Brønsted-Lowry presentes nestes sólidos. Os autores classificam estes compostos catalisadores nas seguintes classes: zeólitas, óxidos e sais inorgânicos, compostos de coordenação e líquidos iônicos, resinas trocadoras de íons, ácidos e bases orgânicos e materiais lamelares. No entanto, como visto, o BC é um excelente candidato para aplicações catalíticas e pode ser incluído nesta classificação.

3.6.1 Catalisadores baseados em BC

O BC resultante do processo de pirólise é um material que permite a sua utilização como suporte catalítico com propriedades particulares como a fácil adsorção de metais, e podem ser considerados ideais devido as características desejáveis de um suporte: material de baixo custo, alta área de superfície e estabilidade térmica. Além disso, os catalisadores produzidos a partir do BC de biomassa geralmente são atóxicos, não corrosivos e biodegradáveis, sendo facilmente descartados após seu ciclo de uso até a sua desativação (ROCHA; OLIVEIRA; FRANCA, 2019)

Para tanto, o BC é facilmente funcionalizado, podendo adquirir sítios catalíticos ácidos ou básicos (ativação química), e/ou adsorver compostos catalíticos (impregnação). A aquisição de sítios catalíticos ácidos (a reação de TE requer fortes sítios catalíticos ácidos) pode ser obtida pelo processo de sulfatação do BC que ocasiona a introdução de grupo sulfato ($-\text{SO}_3\text{H}$) no BC (KONWAR; BORO; DEKA, 2014; LEE; KIM; KWON, 2017). A alta densidade de grupos de ácido sulfúrico no BC sulfatado, o torna uma alternativa ao uso do H_2SO_4 nas reações de biodiesel de microalgas (DONG *et al.*, 2015). Rocha, Oliveira e Franca (2019), por exemplo, aplicaram a sulfatação em BC de espigas de milho e o utilizaram como catalisador heterogêneo na reação de TE do óleo de soja assistida por micro-ondas, resultando 88,7% de conversão. O catalisador à base de resíduo de microalga (após extração de óleo), obtido por carbonização parcial e sulfonação da biomassa residual com ácido sulfúrico, mostrou 98% de conversão na reação de esterificação do ácido oleico (FU *et al.*, 2013).

Alternativamente, os poros encontrados no BC podem ser utilizados como suporte de compostos catalisadores metálicos por exemplo. A impregnação úmida é uma técnica comum para se carregar a superfície do BC com as nanopartícula metálicas de interesse (XIONG *et al.*, 2017). Nesta técnica o BC é imerso em uma solução aquosa do sal metálico ou óxido metálico, seguida, da calcinação da amostra (PHAM; KHANH; NGUYEN, 2016; XIONG *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2015). A partir da solução aquosa de RuCl_3 , Zhu *et al.* (2015) realizaram a impregnação do BC de casca de arroz por rutênio (Ru/BC), e alcançaram desempenho catalítico satisfatório na reação de metanação. O catalisador de níquel suportado em BC (Ni/BiC) produzido por Paham *et al.* (2016), obtido a partir da solução aquosa de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, indicou potencial para aplicação no processo de hidredesoxigenação. Outras partículas metálicas podem ser carregadas de maneira semelhante, como por exemplo, platina (Pt), cobre (Cu), zinco (Zn), cobalto (Co), molibdênio (Mo) e cálcio (Ca) são citados como partículas já suportadas em BC (KONWAR; BORO; DEKA, 2014; LONG *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2017; PHAM; KHANH; NGUYEN, 2016).

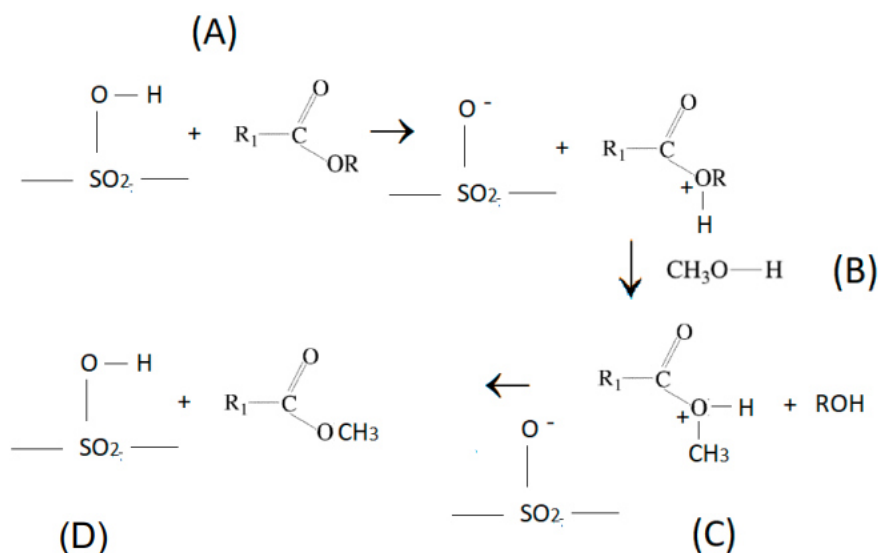
A boa atuação de catalisadores sólidos na reação de TE depende da acidez de Lewis dos sítios catalíticos (CORDEIRO *et al.*, 2011). Na definição Lewis, elucidada por Moreno e Rajagopal (2009), ácido é qualquer substância que atua como receptor de um par de elétrons, logo, a interação dos sítios catalíticos com metais resulta em sistemas não próticos que garantem a formação dos sítios de Lewis no catalisador sólido.

Comumente, os metais de transição garantem a melhor formação dos sítios de Lewis devido aos orbitais *d* incompletos, capazes de receber elétrons (MORENO; RAJAGOPAL, 2009). Em vista disso, a impregnação a partir da solução aquosa de sais dos metais de transição (cloretos, nitratos e sulfatos) pode dar origem a catalisadores baseados em BC para a reação de TE. Guo *et al.* (2013) analisaram os efeitos da adição de diversos cloretos metálicos (FeCl_3 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 , AlCl_3 , CoCl_2 e LiCl) junto ao líquido iônico tosilato de 1-butil-3-metilimidazólio na acidólise do óleo bruto de pinhão-manso com ácido oleico. Os autores relataram que, em todos os casos, as reações de TE tiveram melhor desempenho ao se adicionar o cloreto metálico, em particular, o ZnCl_2 . Neste caso, a mistura dos íons metálicos no líquido iônico suprimiram os sítios de Lewis necessários para a reação de TE. Apesar do desempenho satisfatório da mistura com líquidos iônicos,

a grande maioria dos líquidos iônicos reportados utilizam rotas complexa e caras, e demonstram baixa reaproveitamento e não são biodegradáveis (KONWAR; BORO; DEKA, 2014).

Outra proposta de atuação de catalisadores sólidos considerada eficiente na reação de TE é dependência da acidez de Brønsted dos sítios catalíticos. Em catalisadores heterogêneos de acidez de Brønsted, os sítios ácidos da superfície do sólido (representado pelo grupo $-\text{SO}_3\text{H}$ na Figura 14 A) interagem com o oxigênio da carbonila ($\text{C}=\text{O}$), ou seja, o íon H^+ é doado para a molécula de éster, formando um carbocátion ($-\text{OR}^+\text{H}$, Figura 14 B). Esse intermediário do éster pode agora interagir com o álcool nucleofílico que incorre na formação de intermediários tetraédricos (Figura 14 C) liberando o álcool ($\text{R}-\text{OH}$). Finalmente, o sítio superficial carregado negativamente $-\text{SO}_3^-$ reage com H^+ do éster tetraédrico liberando o éster alquílico e o sítio ácido se regenera (Figura 14 D) (LEE *et al.*, 2022; VAKROS, 2018).

Figura 14 - Esquema da reação de TE sob catalisadores sólidos de acidez de Brønsted.



Sítios ácidos da superfície do sólido representado pelo grupo $-\text{SO}_3\text{H}$

Fonte: VAKROS (2018)

Uma proposta de ácido de Brønsted considerada eficiente na reação de TE são os superácidos da classe dos polioxoânions de Keggin, os heteropoliácidos (HPAs), que apresentam estabilidade, baixa volatilidade, tolerância a água e altos teores de AGL, e elevada atividade (ácidos de Brønsted fortes), pois a natureza

catalítica ácida destes ácidos e seus sais ocorrem devido à baixa afinidade protônica destes resultando em alta mobilidade protônica (KOZHEVNIKOV, 2002; OREGÉ *et al.*, 2022). Os catalisadores de HPA são considerados catalisadores verdes multifuncionais devido à sua alta capacidade oxidante, forte acidez (próximos da região superácida), estabilidade térmica, e principalmente por ser ecologicamente corretos em comparação com H_2SO_4 , HCl ou HF (ALCAÑIZ-MONGE; TRAUTWEIN; MARCO-LOZAR, 2013; OREGÉ *et al.*, 2022).

Os HPAs são formados pela condensação de duas ou mais espécies de oxianions. Os HPAs são compostos por átomos de adenos ácido de hidrogênio-oxigênio com vanádio (V), molibdênio (Mo) ou tungstênio (W) e heteroátomos como silício (Si), arsênio (As) ou fósforo (P) (OREGÉ *et al.*, 2022). De acordo com Tremiliosi (2009), a formação dos ânions poliácidos depende da eletroafinidade do complexo, geralmente, a formação dos complexos tende aumentar com o decaimento da eletroafinidade. Por consequência, os oxianions e óxidos anfóteros com eletroafinidade baixa resultam em heteropoliânions. Os heteropolimetalatos de metais da segunda e terceira série de transição apresentam grupos $[\text{WO}_6]$ com geometria pseudo-octaédrica e simetria C_{4v} e oxoânions de simetria T_d de metais de transição ou não-metais no centro da estrutura (TREMILIOSI, 2009).

Os HPAs apresentam diversas variações de estrutura, uma delas, por exemplo, são as estruturas de Keggin (Figura 15).

Figura 15 - Estrutura de Keggin de fórmula geral $\text{XM}_{12}\text{O}_{40}$



Fonte: Gumerova e Rompel (2018)

De maneira geral, a fórmula química do HPA de Keggin é escrita por $[X^{n+}M_{12}O_{40}]^{(8-n)-}$, onde o heteroátomo X^{n+} pode ser um elemento do bloco p da tabela periódica (P^{5+} ou Si^{4+}), e o átomo metálico M é um elemento de metal de transição da tabela periódica (W^{6+} ou Mo^{6+}) (LIMA, 2019). Apesar de diferentes possibilidades de heteroátomos X e átomo metálico M, os compostos $H_3PW_{12}O_{40}$ (HPA-W), $H_3PMo_{12}O_{40}$ (HPA-Mo) e $H_4SiW_{12}O_{40}$ são os mais estudados e disponíveis comercialmente (LIMA, 2019).

Os HPAs que possuem as estruturas de Keggin são termicamente mais estáveis, facilmente obtidos e podem ser utilizadas como catalisadores ácidos, quanto como catalisadores oxidativos em ambos os sistemas homo e heterogêneo (TANABE *et al.*, 1989). Para mais, o HPA do tipo Keggin pode ter sua área de superfície melhorada pela imobilização em um material transportador adequado como carbono (BC), sílica, resina, zeólita e óxidos metálicos que têm sido utilizados para imobilização (OREGE *et al.*, 2022).

Park *et al.* (2008) reportaram o uso de materiais inorgânicos puros como catalisadores ácidos, incluindo HPAs imobilizados, zircônia sulfatada, alumina, sílica e zircônia tungstenada, na TE de AGL de óleos vegetais residuais com metanol. Todos estes catalisadores apresentaram poder ácido e foram utilizados nos ensaios na concentração de 20% (m/m). Zircônias sulfatadas e tungstenadas foram os catalisadores mais ativos, no entanto, como a zircônia sulfatada sofre lixiviação dos grupos sulfatos na presença de solventes polares como o metanol, foi utilizada zircônia tungstenada na forma de pellet em reator de leito fixo sob condições operacionais contínuas.

Helmi *et al.* (2021) obtiveram 90,39% de conversão do óleo de cozinha utilizando HPA de Mo suportado em óxido de grafeno em temperatura por método eletrolítico. O catalisador heterogêneo ácido de HPA-Mo suportado em óxido de alumínio, utilizado por Zorn *et al.* (2020), demonstrou ser eficiente na TEIS da biomassa das microalgas *Chlorella minutissima* e *Nannochloropsis gaditana* com conversão de 96,6% e 96,9%, respectivamente. Em outro estudo, Zorn *et al.* (2022b) obtiveram excelentes resultados na TEIS utilizando o catalisador heterogêneo ácido de HPA-Mo suportado em NbO_5 na geração de biolubrificantes a partir da biomassa de consorcio de microalgas-fungo. O consorcio das microalgas *Dunaliella salina* e *Scenedesmus obliquus* com o fungo *Mucor circinelloides*, atingiram conversões de 97,58% e 96,80% respectivamente. Alcañiz-Monge *et*

al.(2013) obtiveram 76% de conversão na esterificação do ácido palmítico catalisada pelo HPA-Mo impregnado em BC ativado de bambu. Também, o HPA-Mo imobilizado em BC de resíduo agroindustrial (madeira de candeia após extração de óleo essencial) mostrou-se eficiente na esterificação do ácido láurico com metanol, atingindo conversão de 80%.

Já as aplicações do BC impregnado com HPA-W foi aplicado com sucesso por Ferreira *et al.* (2011) na acetilação de glicerol com alta atividade catalítica (86% de conversão) e seletividade para diacetina. Em outro estudo, o HPA-W suportado em zircônia (ZrO_2) aplicado por Alcañiz-Monge *et al.* (2018) resultou em 95% de conversão na esterificação do ácido palmítico.

Assim sendo, tem-se a evidência de que tanto a impregnação por cloreto de zinco ($ZnCl_2$), quanto a impregnação por HPAs, em específico o ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$ – HPA-Mo), são viáveis no desenvolvimento do catalisador baseado em BC.

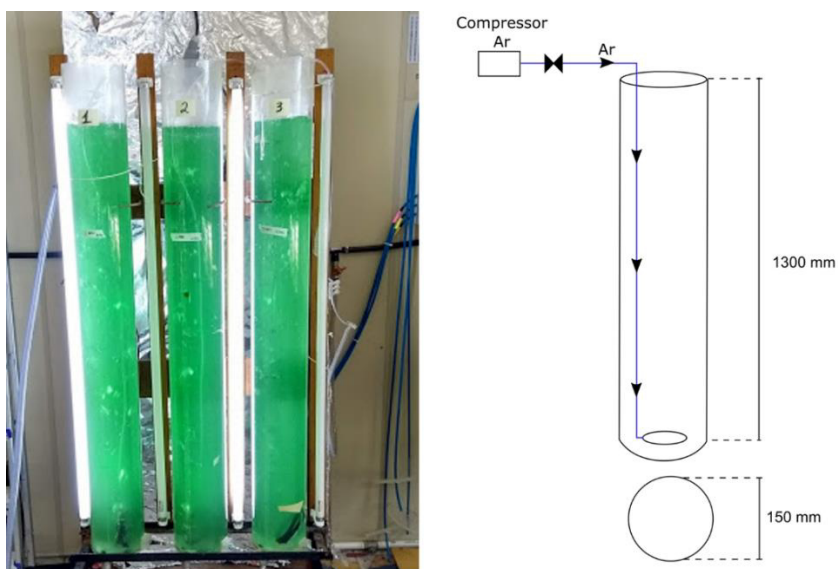
Bhattacharya e Goswami (2020) reforçam que não é apenas a distribuição de diversos produtos de alto valor agregado que devem ser pensados em biorefinarias: os nutrientes, água, gás carbônico e luz devem ser empregados de maneira inteligente para que a biorefinaria tenha êxito, ou seja, ciclos de fluxos de energia e matérias devem ser fechados à própria planta. Assim, um catalisador a base de BC de biomassa residual (extração de lipídios, carboidratos e ficocianina) preparado por processos termoquímicos, além de gerar outros biocombustíveis de valor agregado (bio-óleo e biogás), são meios mais eficientes de fechar o fluxo circular de matérias em biorefinarias do que apenas destinar a biomassa residual para alimentação animal. Por ter um cultivo já consolidado e pela qualidade do BC, a cianobactéria do gênero *Spirulina* torna-se um candidato viável à produção do BC na sua aplicação como suporte catalítico, além da produção do pigmento ficocianina que tem alto valor agregado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivos das microalgas e cianobactérias

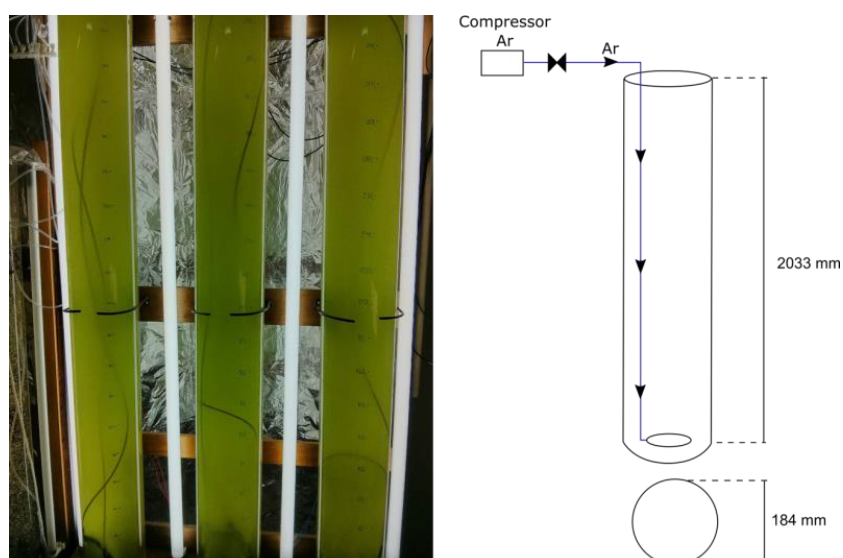
As cepas das espécies, *B. braunii* (CCMA-UFSCar 399) e *S. maxima* (CCMA-UFSCar 94), foram fornecidas pela Coleção de Culturas de Microalgas e Água Doce da UFSCAR. Os inóculos de *S. maxima* foram mantidos em meio de cultivo ZARROUK (ZARROUK, 1966) enquanto os inóculos da microalga *B. braunii* foram mantidos em meio de cultivo WC (LOURENÇO, 2006). Ambos cultivos foram mantidos em cepário com controle de temperatura (23°C) e de luminosidade (800 lux). A produção de biomassa das microalgas e cianobactérias foi realizada em fotobiorreatores de coluna de bolhas com volume útil de 18 L cada (Figura 16) e de 40 L cada (Figura 17), construídos em acrílico, com aeração e iluminados por lâmpadas fluorescentes, 24 h por dia. A colheita da biomassa de *B. braunii* foi realizada por floculação com sulfato de alumínio, separada por filtração a vácuo e posteriormente armazenada a frio. Enquanto a biomassa *S. maxima*, devido à sua fisiologia filamentosa, foi filtrada por gravidade em manta de poliéster, posteriormente seca em estufa a 40°C e armazenada em dessecador.

Figura 16 - Fotobiorreatores de coluna de bolhas de 18 L.



Fonte: Próprio autor

Figura 17 - Fotobiorreatores de coluna de bolhas de 40 L.



Fonte: Próprio autor

4.2 Acompanhamento do crescimento celular

Para o acompanhamento do perfil de crescimento das espécies cultivadas, foram realizadas leituras de absorvância (ABS) diárias de amostras coletadas periodicamente em condições assépticas. As leituras de ABS foram feitas em espectrofotômetro UV-Visível (QUIMIS, modelo Q8980áciPT), selecionando o comprimento de onda de 680 nm, utilizando água como branco (LOURENÇO, 2006). Ao atingir a fase estacionária (de 10 a 15 dias), os cultivos foram encerrados e realizado a colheita da biomassa.

4.3 Propagação e colheita de cultivo de *B. braunii* e *S. maxima*

Em consequência da dificuldade do crescimento da linhagem em volume maior dos cultivos de *B. braunii* e *S. maxima* para a produção de biomassa, foi necessário a investigação em menor escala dos fatores que contribuiriam negativamente ao crescimento celular das espécies de microalgas. Por não fazer parte do escopo do projeto deste trabalho, a metodologia, os parâmetros investigados e os resultados são apresentados no Apêndice A.

4.4 Preparação do catalisador heterogêneo de BC de microalgas

4.4.1 Pirólise da biomassa e purificação do BC

A biomassa, previamente seca em estufa a 40°C por 48h para remoção total da umidade, foi macerada e peneirada, sendo adicionada em seguida a um cadinho de cerâmica e pirolizado em forno tubular com atmosfera inerte de nitrogênio com rampa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ até atingir a temperatura de final de 310°C e mantido por 60 min. O BC foi obtido por pirólise lenta a fim de se obter elevados rendimentos em sólidos.

O BC obtido foi macerado e lavado com solventes para retirada de traços de bio-óleo e/ou alcatrão e compostos solúveis em água. A lavagem com solventes foi feita em extrator soxhlet com a proporção de 15 mL da mistura clorofórmio:metanol (1:1 v/v) para cada grama de BC. A amostra foi seca em estufa a 105°C por 12 h. Em seguida, o BC foi lavado com água na proporção 50 mL de água por grama de BC. A suspensão de água e BC foi neutralizada com solução de HCl 0,1 M até pH neutro (pH=7), seguida da filtração à vácuo, lavagem até o clareamento da água de lavagem, e seco em estufa a 105°C por 12 h.

Posteriormente, foi percebida a necessidade da oxidação das amostras de BC por H₂O₂ e HNO₃ a fim de diminuir a reação do catalisador (HPA) com os grupos de superfície do BC. Primeiramente, foi realizada a oxidação com H₂O₂ na proporção de 10 mL de solução de H₂O₂ (10%) por grama de BC, a 60°C por 4 h. A amostra foi filtrada a vácuo e lavada até o clareamento da água de lavagem. Em seguida, foi realizada a oxidação do BC com HNO₃ na proporção de 10 mL de solução de HNO₃ (10%) por grama de BC, também a 60°C por 4 h. A amostra foi então filtrada a vácuo, lavada com água até pH neutro (7,0) e seco em estufa a 105°C por 12 h.

4.4.2 Impregnação do catalisador no BC por via úmida

A impregnação do BC (lavado e oxidado) pelos compostos catalisadores foi realizada por vias diferentes: umidade incipiente e excesso de solvente. Na

úmida incipiente, ou impregnação por “volume de poros”, a mais comumente utilizada para fixar os HPA nos suportes catalíticos, utiliza-se apenas líquido o suficiente (solução dos precursores) para preencher o volume de poros do suporte (NARKHEDE; SINGH; PATEL, 2015). Foi utilizado o método descrito por Carvalho *et al.* (2017) e Conceição *et al.* (2017): a massa de HPA de molibdênio (HPA-Mo, 30% m/m) foi dissolvida em solução alcoólica 70% (volume de poros) e transferida gota a gota para cadinho contendo o suporte e então misturados. O sólido formado é seco a 105°C por 1 h e posteriormente calcinado a 300°C por 3 h. As amostras foram armazenadas em dessecador. Na impregnação por excesso de solvente, ou impregnação úmida, o suporte é mergulhado em excesso de solução contendo o precursor da fase ativa (HPA neste caso), ocorrendo a difusão do soluto dentro do sistema de cavidades porosas e adsorção do soluto pela parede do poro (NARKHEDE; SINGH; PATEL, 2015). A impregnação por excesso de solvente foi realizada pela suspensão do BC em solução aquosa do ZnCl₂ e HPA de molibdênio (HPA-Mo) em múltiplas concentrações (0,34 mM, 2 mM, 6 mM, 10 mM e 11,66 mM) conforme o planejamento experimental. A proporção foi de 1 g de sólido para 50 mL de solução. A suspensão foi mantida com agitação magnética em temperatura ambiente por 24 h. Por fim, a suspensão foi filtrada a vácuo, lavada com excesso de água e seca em estufa a 105°C por 12 h (ALCAÑIZ-MONGE *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2015). As amostras foram armazenadas em dessecador.

4.4.3 Caracterização físico-química

Por meio da caracterização físico-química do BC e BC impregnado, foi possível determinar as principais propriedades como, morfologia, textura, composição e acidez superficial. As amostras dos BCs tiveram sua acidez superficial ($\text{mmol H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{sólido}$) medidas conforme o procedimento descrito por Conceição *et al.* (2017).

Os métodos analíticos para caracterizar os catalisadores foram: análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia no infravermelho (FT-IR), área superficial específica (ASE), volume total de poros (VTP) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises de TGA foram realizadas na Faculdade de Engenharia e Guaratinguetá (UNESP), e as análises de ASE e VTP foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da EEL (Área I), enquanto as análises de

FT-IR e MEV foram realizadas no Departamento de Engenharia de Materiais da EEL Lorena (Área II).

4.4.3.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA da biomassa de *S. maxima* foi realizada na Faculdade de Engenharia e Guaratinguetá (UNESP) no Laboratório de Combustão & Captura de Carbono (LC₃). O equipamento de análise termogravimétrica/calorimetria exploratória diferencial (TGA/DTG e DSC) utilizado mede tanto fluxo de calor quanto variações de massa do material em função da temperatura (ou tempo) sobre atmosferas controlada. As medições de variação de massa foram realizadas em balança termogravimétrica (TA Instruments, modelo Q600 SDT) utilizando 5,0 mg de biomassa seca em cadinho de alumina, com taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ até atingir temperatura máxima de 600°C e atmosfera inerte de N₂ a 100mL.min⁻¹.

4.4.3.2 Análise de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de BCs passaram por análise de FTIR a fim de identificar as modificações e grupos funcionais da superfície conforme o tratamento aplicado. A análise de infravermelho foi realizada em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR) Shimadzu modelo IRPrestige-21 do Departamento de Engenharia de Materiais da EEL – USP. Foram analisadas a região do infravermelho médio na faixa de 4000-400 cm⁻¹, a uma resolução de 4 cm⁻¹, com total de 32 varreduras, empregando o brometo de potássio (KBr) como matriz.

4.4.3.3 Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras de biomassa e BCs foram realizadas a fim de comparar as alterações morfológicas na superfície após as etapas de carbonização da biomassa, bem como o BC impregnado com o catalisador. As imagens morfológicas foram obtidas em MEV de mesa Hitachi TM 300 do Departamento de Engenharia de Materiais da EEL – USP. As amostras foram secas em estufas a

100°C por 60 min para retirar umidade residual e, posteriormente, foram metalizadas com prata e analisadas em seguida.

4.4.3.4 Análise de área de superfície por Brunauer-Emmett-Teller (BET)

A análise de área superficial e porosidade das amostras de BCs foram obtidas pelas isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio a -196°C em um analisador de adsorção V-Sorb 2800P da Gold APP Instruments do Departamento de Engenharia Química da EEL – USP. As amostras foram degaseificadas sob vácuo a 120°C e então analisadas. A área superficial específica foi determinada pelo método BET.

4.5 Ensaio de pré-tratamentos (ativação química em uma etapa) da biomassa de *S. maxima* para a produção de BC

O BC diretamente obtido por pirólise é considerado uma massa de carbono fixa com estrutura de poros considerada rudimentar. Assim, o pré-tratamento químico (ativação química em uma etapa) tem como objetivo alargar os diâmetros dos poros e criar poros por meio da matéria-prima impregnada com agentes químicos (HERNANDEZ-MONTOYA; GARCA-SERVIN; BUENO-LOPEZ, 2012).

Nesta etapa do desenvolvimento, as amostras de biomassas foram ativadas quimicamente utilizando H₃PO₄, KOH e ZnCl₂ conforme o delineamento experimental apresentado no item 4.5.1. Cerca de 5 gramas da biomassa seca foram adicionados a um cadinho de cerâmica e o pré-tratamento com os agentes químicos foram realizados no percentual mássico e temperatura estipulada no planejamento experimental, com a adição de 0,75 ml de água para garantir a homogeneização e mantido em agitação magnética durante 1 h. As amostras foram, então, pirolisadas em forno tubular com atmosfera inerte de nitrogênio com rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ até atingir a temperatura de final de 310°C e mantido por 60 min. Os BCs obtidos seguiram os mesmos passos de purificação apresentados no item 4.4.1: lavagem dos sólidos com solventes e lavagem com água até pH neutro. As amostras foram secas em estufa a 105°C por 12 h.

4.5.1 Delineamento do planejamento experimental

Os ensaios de tratamento da biomassa *in natura* foram realizados variando o tipo de ativador, percentual do ativador (% m/m) e temperatura de impregnação do ativador (°C) com o propósito de determinar a melhor condição de pré-tratamento da biomassa de *S. maxima* para o processo de pirólise e obtenção de BC poroso.

Os ensaios foram estudados pelo planejamento experimental L9 de Taguchi com três fatores independentes e três níveis apresentados na Tabela 4. Os ensaios seguiram a matriz experimental conforme a Tabela 5. Os resultados foram analisados estatisticamente, e assim, inferido a condição de tratamento da biomassa que maximize as variáveis resposta.

Tabela 4 - Fatores e níveis dos ensaios de tratamento da biomassa para produção de BC

Fator Codificado	Fator	Níveis		
		1	2	3
A	Ativador	H ₃ PO ₄	ZnCl ₂	KOH
B	Percentual do ativador (% m/m)	10	50	75
C	Temperatura de impregnação do ativador (°C)	25	50	80

Fonte: Próprio autor

Tabela 5 - Matriz experimental do planejamento L9 de Taguchi com nove fatores e três níveis

Experimento	Fatores			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Fonte: Próprio autor

As variáveis respostas analisadas foram: área superficial (m².g⁻¹) e adsorção do corante Azul de Metileno (mg.g⁻¹). Os resultados das variáveis respostas foram analisados estatisticamente (ANOVA e Gráfico de Efeitos). Todos

os gráficos de efeitos do método de Taguchi e ANOVA das variáveis manipuladas foram gerados pelo software Statistica 10.

4.5.2 Adsorção de Azul de Metileno

Previamente, foi preparado uma solução de Azul de Metileno a 10 mg.L^{-1} (10 ppm). Em um tubo de ensaio foram colocados 10 mL da solução do corante e 0,1 g de BC. O tubo de ensaio foi agitado eventualmente a cada 5 min por 30 min em temperatura ambiente em condições escuras. Seguido, então, da centrifugação a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante e a solução a 10 mg.L^{-1} teve a ABS medida em espectrofotômetro de UV-visível no comprimento de onda de 673 nm, utilizando água como branco (DE MORAES *et al.*, 2018, 2020). Por curva de calibração, foi determinado a adsorção do corante pelo BC (em mg.g^{-1}) pela diferença entre a ABS antes e depois da adsorção.

4.6 Ensaios de esterificação heterogênea de ácido palmítico – Seleção do suporte de BC

A reação de esterificação do ácido palmítico, um precursor do biodiesel, foi realizada como maneira de avaliar o poder catalítico dos catalisadores heterogêneos de BC. As reações foram realizadas em balão de vidro de fundo redondo de 100 mL conectado a um condensador de refluxo em banho termostático de glicerina. Uma alíquota de 1 g de ácido palmítico P.A. foi colocada no balão e adicionados 15 mL de álcool etílico P.A. (proporção molar ácido graxo:álcool de 1:97) e 300 mg do catalisador de BC impregnado (30% m/m ácido palmítico). As reações foram mantidas sob agitação magnética a 100°C por 4 h. Ao término da reação, o meio reacional foi resfriado até temperatura ambiente.

A purificação ocorreu de acordo com o método descrito por Pavia *et al.* (2009) e Ehimen; Sun; Carrington (2010): a mistura reacional foi filtrada em papel de filtro e lavado com etanol P.A., transferidos para um funil de separação e adicionados hexano e água destilada morna ($\sim 45^\circ\text{C}$) na proporção 1:1 (v:v). A mistura foi agitada e posta em repouso até a completa separação de fases (cerca

de 4 h). A fase aquosa contendo o álcool e água formada na reação é descartada e a fase orgânica contendo os ésteres e ácidos graxos não convertidos são novamente lavados com água. O procedimento é repetido uma terceira vez. Posteriormente, adicionou-se sulfato de sódio anidro na fase orgânica para remoção de vestígios de água presentes na amostra. Por fim, a amostra é colocada em frasco previamente pesado e colocados em estufa a 60°C durante 24 h para evaporação do solvente. Após evaporação do solvente, o frasco contendo os ésteres e ácidos graxos não convertidos é pesado novamente.

A conversão da reação de esterificação foi determinada por titulação com solução de KOH 0,1M e indicador fenolftaleína. A amostra foi diluída em 25 mL da mistura de etanol e éter etílico (1:2, v:v), adicionado três gotas do indicador e, então, titulada anotando-se o volume de KOH utilizado. Previamente, foi realizado em triplicata a titulação do ácido palmítico P.A. para determinação do índice de acidez. O índice de acidez foi calculado pela equação (1).

$$I = \frac{V_{KOH} \cdot C_{KOH} \cdot MM_{KOH}}{m_{AC}} \quad (1)$$

Onde I é o índice de acidez ($\text{mg}_{KOH} \cdot \text{g}^{-1}$), V_{KOH} é o volume titulado de KOH, C_{KOH} é a concentração da solução de KOH, MM_{KOH} é a massa molecular de KOH e m_{AC} é a massa do ácido palmítico.

Logo, a conversão é calculada pela equação (2):

$$\% EE = \frac{I_i - I_f}{I_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde $\%EE$ é o percentual de conversão em ésteres etílicos, I_i o índice de acidez inicial e I_f o índice de acidez final após a reação.

4.7 Ensaios de transesterificação (TE) heterogênea de óleo de macaúba

As reações de TE heterogênea foram realizadas em reator pressurizado (sistema de reator múltiplo PARR Series 5000). O sistema consiste em um reator de aço inoxidável pressurizado de 150 mL equipado com revestimento de aquecimento elétrico, controle de temperatura e agitação mecânica.

Uma alíquota de 4 g do óleo de macaúba foi colocada no reator e adicionados 25,5 g de álcool etílico P.A. (proporção molar óleo:álcool de 1:120) e a

massa do catalisador de BC impregnado correspondente, conforme delineamento experimental (Item 4.7.1). A reação ocorreu com agitação de 300 rpm, temperatura de 200°C com agitação de 300 rpm por 2 h. O catalisador de BC, ao final da reação, foi separado da mistura reacional por centrifugação a 2500 rpm durante 15 min. O meio foi transferido para um tubo falcon de 50 mL, lavado com 12 mL de etanol e adicionados 2 g de amberlite ® previamente ativada, para remoção do glicerol, e colocado em banho de ultrassom por 2 h. Após, o tubo foi centrifugado 2500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e colocado em estufa para a remoção do etanol. As amostras de biodiesel foram analisadas por RMN¹H para a determinação da conversão dos lipídios em ésteres etílicos.

4.7.1 Delineamento do estudo preliminar

Os ensaios de TE heterogênea do óleo de macaúba foram realizados explorando diferentes concentrações de impregnação do BC pelo HPA-Mo, bem como o percentual do catalisador de BC-HPA no meio reacional, com o propósito de determinar a condição de melhor aplicação do catalisador de BC.

Para esta etapa exploratória do projeto, a reação de TE heterogênea do óleo de macaúba foi estudada pelo planejamento fatorial composto central rotacional 2² com repetições no ponto central (Tabela 6). Os fatores (variáveis independentes) foram a concentração da solução de HPA-Mo utilizada na impregnação do BC (fator A) e o percentual mássico, em relação a massa de óleo, do catalisador de BC no meio reacional da TE (fator B). Os níveis de cada fator são apresentados na Tabela 7.

A utilização da concentração de HPA-Mo na impregnação como variável quantitativa (fator A) permite a exploração da saturação dos poros do BC, enquanto que o percentual do catalisador no meio reacional (fator B) permite explorar a quantidade de catalisador necessária para a reação.

Assim, a variável resposta analisada foi o resultado quantitativo da conversão em ésteres etílicos (%EE), dado pela análise de RMN¹H. A variável resposta foi analisada estatisticamente (método de superfície de resposta e ANOVA) pelo software Statistica 10, e inferido as condições que proporcionaram a maximização dos resultados de conversão em ésteres.

Tabela 6 - Matriz experimental do planejamento fatorial composto central rotacional 2² com repetições no ponto central.

Ensaio	Fatores	
	A	B
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Fonte: Próprio autor

Tabela 7 - Fatores e níveis dos ensaios de TE heterogênea

Fator Codificado	Fator	Níveis		
		-1	0	1
A	Concentração de Impregnação de HPA-Mo (mM)	2	6	10
B	Percentual do catalisador (% m/m _{óleo})	20	30	40

Fonte: Próprio autor

O modelo quadrático que prediz o ponto de otimização é expresso pela equação (3).

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (3)$$

Onde Y_i é a variável resposta (variável dependente) para as variáveis independentes $X_i (i = 1 \text{ e } 2)$, e $b_0, b_1, b_2, b_{12}, b_{11}$ e b_{22} são os coeficientes de regressão dos parâmetros. As variáveis independentes estão linearmente relacionadas conforme a equação (4).

$$X_{ki} = \frac{z_i - z_i^0}{d_i} \quad (4)$$

Onde z_i é o valor real da variável de entrada em unidades originais; z_i^0 é o valor central da média aritmética entre os valores dos níveis alto e baixo da variável original z_i e d_i é a metade da diferença dos valores dos níveis alto e baixo da variável original z_i .

4.8 Ensaios de Transesterificação *in situ* (TEIS) heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*

As reações de TEIS heterogênea também foram realizadas em reator PARR como explicado anteriormente no item 4.7.

A alíquota de 1 grama da biomassa seca foi umidificada com teor de umidade padronizado em 84% (teor aproximado de umidade da biomassa após colheita) e posta no reator. O volume de etanol e a massa de catalisador de BC impregnado foram adicionados conforme a matriz experimental. A proporção do co-solvente clorofórmio foi mantida constante em 1:10 clorofórmio:etanol (v/v). A reação ocorreu com agitação de 300 rpm por 2 h, com temperatura conforme o delineamento experimental. O meio reacional, ao final da reação, foi centrifugado a 2500 rpm durante 15 min em tubo falcon para a separação do material sólido, que foi seco e reservado. A mistura remanescente foi filtrada em papel de filtro, transferida para um funil de separação e adicionado a mistura de hexano e água destilada morna (~45°C) na proporção 1:1 (v:v), agitado e posto em repouso por cerca de 12 h para permitir a completa separação entre a fase composta de ésteres etílicos e o glicerol, conforme a metodologia já apresentada em 4.6 (EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010; PAVIA *et al.*, 2009). Esta etapa de lavagem foi realizada três vezes para garantir a remoção total de glicerol. Finalmente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro para remoção de resíduos de água e postos na estufa a 60°C para evaporação dos solventes. As amostras de biodiesel também foram analisadas por RMN¹H para a determinação da conversão dos lipídios em ésteres etílicos de ácido graxo.

4.8.1 Delineamento da exploração

Para esta etapa de exploração do trabalho, as reações foram realizadas variando a massa catalisador de BC, volume de etanol, bem como a temperatura do reator, com o propósito de determinar a melhor combinação destes fatores que maximizassem a catálise heterogênea da TEIS.

Para a exploração do catalisador baseado em BC, a reação de TEIS heterogênea da biomassa úmida da microalga *B. braunii* foi estudada pelo planejamento experimental Box-Behnken (Tabela 8) com três fatores

independentes e três níveis (Tabela 9). Os fatores (variáveis independentes) analisados foram o percentual mássico, em relação a massa de biomassa, do catalisador de BC no meio reacional da TE (fator A), a razão do volume de etanol para cada grama de biomassa e temperatura de trabalho do reator.

Tabela 8 - Matriz experimental do planejamento Box-Behnken com três fatores.

Ensaio	Fatores		
	A	B	C
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fonte: Próprio autor

Tabela 9 - Fatores e níveis dos ensaios da reação de TEIS heterogênea.

Fator Codificado	Fator	Níveis		
		-1	0	1
A	Percentual BC-HPA (% m/m _{biomassa})	10	15	20
B	Razão etanol:biomassa (mL.g ⁻¹)	25	50	75
C	Temperatura (°C)	150	200	225

Fonte: Próprio autor

A utilização do percentual do catalisador no meio reacional (fator A) permite explorar a quantidade de catalisador necessária para a reação na TEIS da biomassa úmida de microalgas, enquanto que a razão álcool/biomassa permite explorar o excesso de álcool adequado para a extração reativa nas condições reacionais aplicadas e evitar desperdícios, e, por fim, a temperatura que permite estabelecer a faixa adequada (média a alta temperatura) para a melhor eficiência de catálise do BC impregnado.

Assim, das análises de planejamento de experimentos, as variáveis resposta foram os resultados quantitativos de rendimento mássico (%m/m),

conversão em ésteres etílicos (%EE), dado pela análise de RMN¹H, e carboidratos residuais (%m/m). As variáveis respostas foram analisadas estatisticamente (método de superfície de resposta e ANOVA) pelo software Statistica 10, e assim inferir quais condições proporcionam a maximização dos resultados tanto em percentual mássico quanto em conversão em ésteres. O modelo quadrático do planejamento Box-Behnken é expresso pela equação (5) (MONTGOMERY, 2013).

$$Y_k = b_{k0} + \sum_{i=1}^k b_{ki}X_i + \sum_{i=1}^k b_{kii} + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{kij}X_iX_j + \varepsilon_i \quad (5)$$

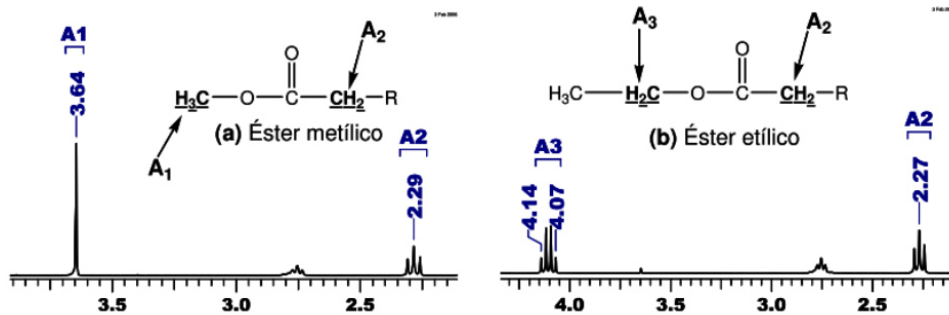
Onde Y_k é a variável resposta (variável dependente) para as variáveis independentes X_i ($i = 1, 2, \dots, k$), ε_i correspondente ao erro aleatório, e b_{k0} , b_{ki} , b_{kii} e b_{kij} são os coeficientes de regressão dos parâmetros. As variáveis independentes estão linearmente relacionadas conforme a equação (4) já apresentada anteriormente.

4.9 Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

A análise de RMN¹H contabiliza o número de hidrogênios presentes na amostra do composto, e pode ser utilizado para confirmar a conversão dos lipídios em biodiesel. As análises de RMN¹H foram realizadas em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz. As amostras são diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e adicionado o tetrametilsilano (TMS) utilizado como referência arbitrária zero na escala do RMN.

Segundo Garcia (2006), existe diferença nos espectros de RMN¹H entre o biodiesel metílico e biodiesel etílico (Figura 18). Segundo o autor, a indicação da presença de éster metílico, reação feita com metanol, em um espectro é um singletto próximo a 3,64 ppm (Figura 18 A) característico de metoxila de éster (CH₃-O) adquirido pelo ácido graxo. No entanto, a presença do éster etílico, reação feita com etanol, é confirmada pelo quarteto entre 4,05 e 4,35 ppm no espectro (Figura 18 B) característico da etoxila de éster (C₂H₅-O) adquirido pelo ácido graxo.

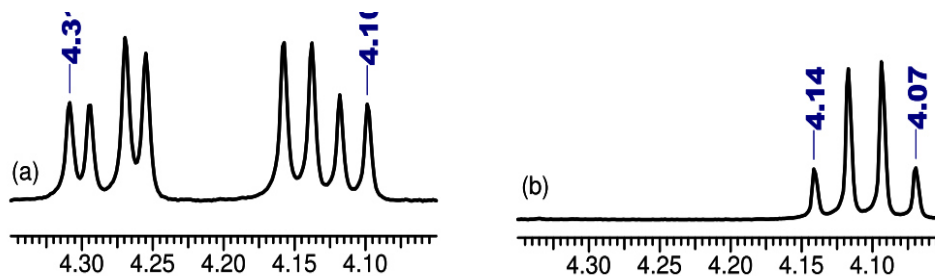
Figura 18 – Espectros de RMN¹H parcial dos deslocamentos químicos de hidrogênios utilizados na quantificação da TE dos lipídios: (a) éster metílico e (b) éster etílico.



Fonte: GARCIA (2006)

O rendimento em ésteres etílicos do processo de TEIS da biomassa de microalgas são estimados pela comparação das áreas dos picos relativos aos ésteres com as áreas dos picos relativos ao lipídio não convertidos no espectro de RMN¹H. Segundo Garcia (2006), a presença de TG, diglicerídeos e monoglicerídeos, que não foram convertidos durante a reação de TE, geram picos de ressonância observáveis entre 4,35 e 4,10 ppm (Figura 19 A), enquanto que os ésteres etílicos geram picos (quarteto) observáveis entre 4,15 e 4,05 ppm apenas (Figura 19 B).

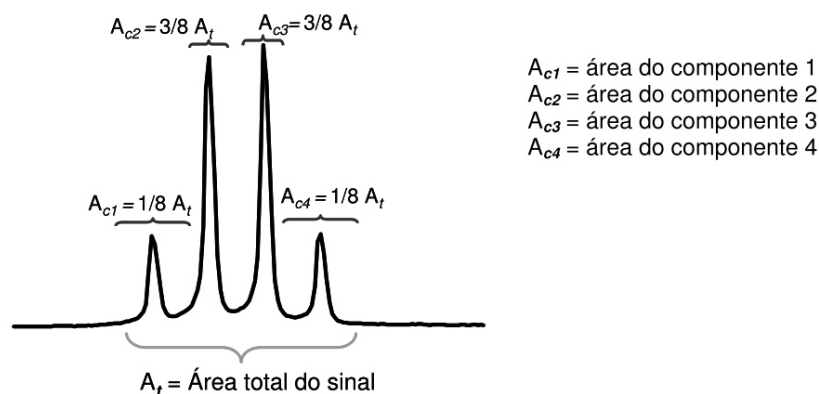
Figura 19 - Espectro parcial de RMN¹H na região entre 4,35 e 4,05 para (a) óleo e (b) ésteres etílicos de ácido graxo.



Fonte: GARCIA (2006)

No entanto, apenas o pico de ressonância próximo a 4,08 ppm (componente 4 da Figura 20) não apresenta a sobreposição de nenhum outro sinal gerado pelos monos, di ou TG. Assim, a proporção entre éster etílico e lipídios não convertido na reação de TE pode ser determinada relacionando a área do quarto componente do quarteto próximo a 4,08 ppm e a área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm.

Figura 20 - Área do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio etoxílicos dos ésteres etílicos em espectro de RMN¹H



Fonte: GARCIA (2006)

Assim, GARCIA (2006) estabelece a seguinte equação (6) para o cálculo da conversão em ésteres etílicos:

$$\%EE = \frac{(A_{C4} \cdot 8)}{A_T} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde A_{C4} é a área do componente C4 (δ na faixa de 4,08 a 4,09 ppm), referente ao éster etílico, e A_T corresponde à área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm, referente tanto aos ésteres etílicos quanto aos mono, di ou TG não convertidos em ésteres etílicos. As áreas foram calculadas pelo software MestReC.

4.10 Determinação de carboidratos (açúcares redutores) na biomassa residual

A determinação de carboidratos foi realizada por hidrólise da biomassa seguida da reação dos açúcares redutores no hidrolisado com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (reagente DNS).

Inicialmente, foi montada uma curva padrão de açúcar redutor utilizando glicose com concentrações variando de 0,1 g.L⁻¹ a 1 g.L⁻¹. Volumes iguais da solução de DNS foram colocadas em cada amostra da curva e levadas para o banho em água fervente. A reação tem início ao atingir 100°C e as amostras foram mantidas por 5 min. Após a reação e resfriamento, a amostra foi analisada em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. As medidas de ABS e de concentração de glicose foram plotadas em planilha e determinada a equação da reta (curva de calibração).

A hidrólise da biomassa foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Moxley e Zhang (2007). O processo envolve uma hidrólise primária, para conversão de polissacarídeos em oligossacarídeos, e uma hidrólise diluída secundária, para conversão de oligossacarídeos em monossacarídeos. O procedimento é descrito a seguir. Cerca de 300 mg de biomassa seca foi colocada em tubo de ensaio, adicionado 3 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) e colocado em banho de água a 30°C por 60 min. Os tubos foram frequentemente agitados com auxílio de bastão de vidro. Após a hidrólise altamente ácida (pré-hidrólise), o hidrolisado do tubo de ensaio foi transferido para um erlenmeyer de 125mL e adicionado 84mL de água destilada atingindo a concentração de 4%(m/m) de ácido sulfúrico. A amostra foi hidrolisada novamente em autoclave a 121°C por 60 min. O hidrolisado foi filtrado em cadinho do tipo Gooch (previamente pesados), postos para secar em estufa a 60°C e posteriormente pesados para determinar a massa não hidrolisada. O filtrado foi neutralizado com 1,45 g de NaOH e armazenada em geladeira.

A concentração de açúcares redutores do hidrolisado da biomassa foi determinada pipetando-se 1 mL do hidrolisado em um tubo de ensaio junto a 3 mL da solução de DNS. A amostra foi aquecida em água fervente por 5 min. Após a reação e resfriamento, adicionou-se 16 mL de água destilada e homogeneizado a amostra. A amostra foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. As análises foram realizadas em triplica. O cálculo da concentração dos grupos redutores da amostra hidrolisada foi realizado utilizando-se a ABS média medida na equação da curva de calibração de açúcares redutores.

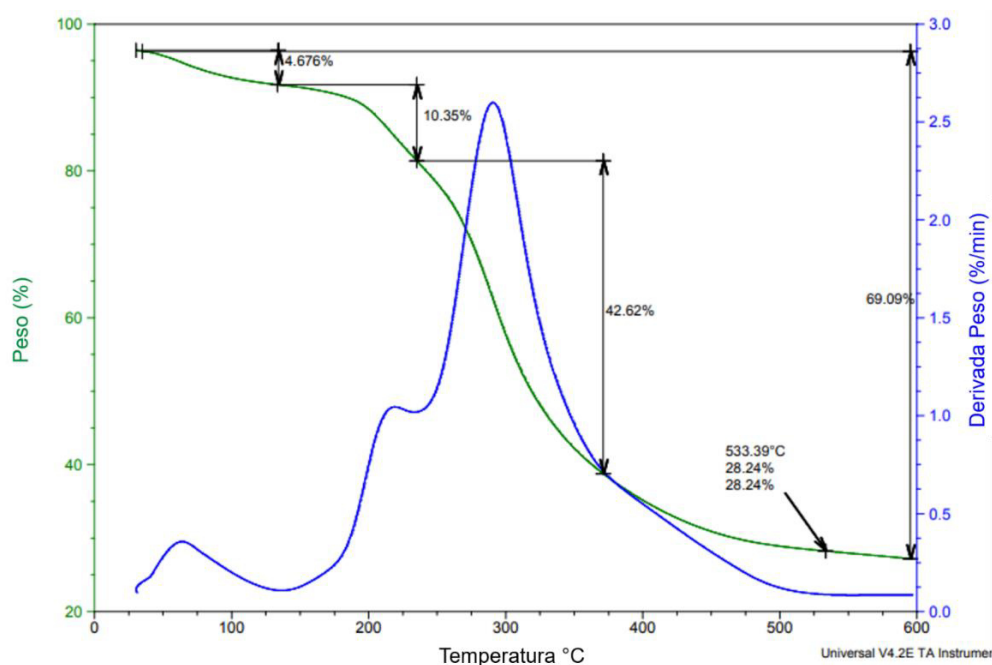
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 BC de *S. maxima*

5.1.1 TGA da biomassa de *S. maxima*

Antes da pirólise da biomassa de *S. maxima*, foi realizada uma análise termogravimétrica para determinar o perfil de decomposição térmica da biomassa por meio das curvas de TGA/DSC (Figura 21). Foi possível determinar as temperaturas de decomposição dos principais componentes da biomassa e antecipar o comportamento na decomposição termoquímica na pirólise da *S. maxima*.

Figura 21 - Curva de decomposição térmica (TGA) análise térmica diferencial da biomassa de *S. maxima*.



Fonte: Próprio autor

A decomposição térmica da biomassa de *S. maxima* exibiu três estágios distintos. Nesta curva (Figura 21), o primeiro estágio apresentado é a desidratação, que iniciou a 25°C até cerca de 125°C. A queda em massa devida à remoção da umidade, representou cerca de 4,68% da massa inicial. O segundo estágio é

volatilização de carboidratos e proteínas, no qual há uma queda drástica de peso, resultando na maior perda de massa como pode ser visto na curva derivada.

De 125°C a 232°C é possível observar um ombro na curva DTG com uma queda de 10,35% da massa inicial. Segundo Figueira (2014), este pico pode ser atribuído a volatilização da ficocianina, onde se tem a degradação proteica e redução na estabilidade térmica causada pela ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia. De 232°C a 357°C, a maior perda em massa no valor de 42,62% da massa inicial, corresponde a degradação dos carboidratos e proteínas. Em 533°C se encerra a volatilização desses compostos voláteis restando 28% da amostra na forma de BC. Acima de 600°C ocorreria o último estágio de volatilização do material carbonoso no resíduo de sólidos (CHAGAS, 2016), estágio que não é de interesse deste trabalho, onde a queda em massa ocorreria lentamente restando somente cinzas ao final. Assim, em 291°C é onde se tem a maior taxa de volatilização da amostra (pico da curva DTG, Figura 21). Chaiwong *et al.* (2013) obteve para *Spirulina sp.*, a temperatura de máxima de decomposição em 324°C, o que já indicava que a reação de pirólise para microalgas pode ocorrer mais facilmente comparada a biomassa lignocelulósica (800-1000°C). No caso deste trabalho, para a *S. maxima*, esse máximo em decomposição é menor (291°C), o que indica que a quantidade de material volátil na espécie cultivada é maior. O processo de pirólise deve ocorrer entre 290 e 355°C para se desprender os compostos voláteis facilmente.

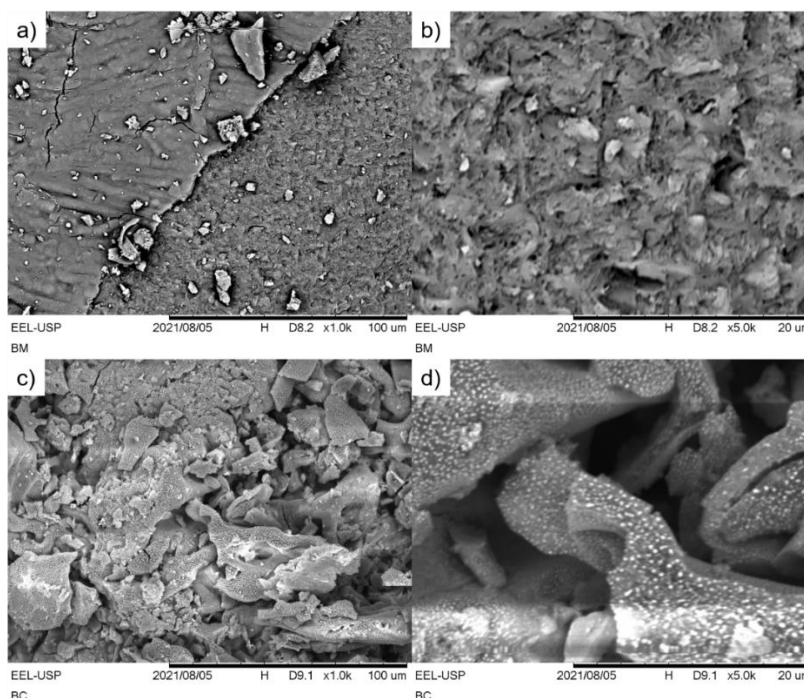
5.1.2 Pirólise da biomassa de *S. maxima* e características físico-química do BC

A pirólise lenta da biomassa de *S. maxima* (10°C.min⁻¹, 310°C) apresentou um rendimento médio em BC bruto de 50,04%, ou seja, uma decomposição 49,96% da biomassa seca, valor muito próximo ao estipulado pela análise de TGA que somou 52,97% da perda de massa no ponto de maior taxa de volatilização. O maior rendimento em BC de *Chlorella vulgaris* observado por Sotoudehniakarani *et al.* (2019) ocorreu na amostra pirolisada a 450°C (42,5%). Segundo os autores, o alto rendimento de BC foi atribuído à baixa temperatura de pirólise, enquanto a espectroscopia Raman confirma as quantidades significativas de cinzas e estruturas de carbono amorfo desordenadas.

No entanto, após lavagem do BC com solventes, neutralização e lavagem com água, o rendimento em BC caiu para 33,99% (perda de 66,01% da massa inicial), presumivelmente, devido a retirada dos compostos solúveis (bio-óleo e outros compostos solúveis em água) retidos na estrutura do BC e também às perdas de massa durante os processos, principalmente no arraste das partículas mais finas durante as filtrações. Ao passo que a oxidação do BC com H_2O_2 e HNO_3 reduziu o rendimento para 23,11%, também, presumivelmente, devido a reação agressiva dos agentes oxidativos com os carbonos da superfície e perdas de massa durante os procedimentos.

Na Figura 22 são apresentadas as imagens de microfotografia de MEV das superfícies da biomassa (Figura 22 A e B) e BC de *S. maxima* (Figura 22 C e D), onde é possível verificar a modificação morfológicas da superfície da biomassa *in natura* e após o processo pirolítico.

Figura 22 - MEV biomassa e BC de *S. maxima*: biomassa *in natura* ampliação de (a) 1000x e (b) 5000x; BC lavado ampliação de (c) 1000x e (d) 5000x.



Fonte: Próprio autor

Pelas microfotografias, observa-se que a biomassa *in natura* seca (Figura 22 A) possui uma superfície predominantemente plana com poucas falhas

superficiais ou cavidades aparentes, resultante do empilhamento de células da cianobactéria na secagem da biomassa (Figura 22 B). Em contraste, na amostra de BC, observa-se a formação de formas irregulares e o grande número de aberturas ao longo da superfície (Figura 22 C), devido ao processo de volatilização dos compostos, e a existência de cavidades irregulares e rugosas (Figura 22 D). Porém, as formas irregulares são grandes e as cavidades porosas consideravelmente baixas quando comparados à outros BCs, como apresentado por Almeida *et al.* (2017) onde é notória a textura rugosa e a formação de cavidades microporosas no BC de semente goiaba, indicativo de alta área superficial.

O resultado da análise de superfície BET demonstrou uma área superficial específica, consideravelmente baixa, de $12,5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e volume de poros de $0,038 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$, em concordância com a baixa porosidade observado nas microfotografias. E como visto na literatura, normalmente o BC de microalgas tem área superficial menor que a área do BC de biomassa lignocelulósica (LAW *et al.*, 2022), principalmente o BC produzido em baixa temperatura de pirólise, esperado valores de área abaixo de $100 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e volume de poro abaixo de $0,3 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ (LI; JIANG, 2017; PATRA *et al.*, 2021). Apesar das características de porosidade serem melhoradas com aumento da temperatura da pirólise (CHANG; TSAI; LI, 2014; LAW *et al.*, 2022) e ativações químicas (LI; JIANG, 2017; PATRA *et al.*, 2021) o rendimento mássico em BC cai drasticamente pela volatilização do BC e destruição das estruturas do BC pela ativação agressiva (TAN *et al.*, 2017). Na Tabela 10 são apresentados alguns resultados de área BET em BC de microalgas encontradas na literatura, evidenciando a baixa área superficial em BC de microalgas.

No trabalho apresentado por Sotoudehniakarani *et al.* (2019) as áreas de superfície BET foram muito baixas em todas as amostras de BC de *Chlorella vulgaris* analisadas, com pouca variação causada pela temperatura de pirólise: $2,9 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ a 450°C , $2,8 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ a 500°C e $2,2 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ a 550°C . Enquanto que, no estudo de Chang *et al.* (2014) com altas temperaturas, as áreas BET tiveram um salto significativo no aumento de 900°C para 950°C , de $9,92 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para $341,71 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, respectivamente. O aumento da área BET foi ainda maior com o aumento do tempo de residência de 0 min para 30 min, de $555,1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ a 900°C para $840,49 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ a 950°C . No entanto, as perdas em massa foram expressivas, com rendimento em BC variando entre 13,8% e 29,4%.

Tabela 10 - Área de superfície BET em BC de microalgas.

Autor	Microalga	Condições da pirólise	Ativação	Área de Superfície BET (m ² .g ⁻¹)
GRIERSON <i>et al.</i> (2011)	<i>Tetraselmis chui</i>	500°C, 10°C/min, 20min	-	19,03
CHANG <i>et al.</i> (2014)	<i>Chlorella sp</i> (Resíduo extração de óleo)	800°C, 0 min	-	0,45
		850°C, 0 min	-	0,70
		900°C, 0 min	-	9,92
		950°C, 0 min	-	341,71
		1000°C, 0 min	-	450,06
		800°C, 30 min	-	310,44
		850°C, 30 min	-	459,99
		900°C, 30 min	-	555,10
950°C, 30 min	-	840,49		
NAUTIYAL <i>et al.</i> (2016)	<i>Spirulina platensis</i> (Resíduo TEIS)	450°C, 20°C/min, 120 min	-	167
NGUYEN <i>et al.</i> (2016)	não especificada	400°C, 120min	-	65,71
ZHENG <i>et al.</i> (2017)	<i>Chlorella sp</i>	600°C, 30min	-	6,16
	<i>Coelastrum sp</i>	600°C, 30min	-	2,12
	<i>Chlamydomonas sp</i>	600°C, 30min	-	15,03
HO <i>et al.</i> (2019)	<i>Spirulina</i> (Resíduo extração de Ficocianina)	400°C, 15°C/min, 90min	-	67
		700°C, 15°C/min, 90min	-	88,6
		900°C, 15°C/min, 90min	-	117,9
SOTOUDEHNIAKA RANI <i>et al.</i> (2019)	<i>Chlorella vulgaris</i>	450°C, 0,5kg/h, 6,4 s	-	2,90
		500°C, 0,5kg/h, 6,4 s	-	2,80
		550°C, 0,5kg/h, 6,4 s	-	2,20
		<i>C. vulgaris</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Synechococcus leopoliensis</i>	550°C, 0,5kg/h, 6,4 s	-
AMIN <i>et al.</i> (2020)	<i>Chlorella sp</i> (Resíduo extração de óleo)	450°C, 10°C/min, 60min	-	266
		550°C, 10°C/min, 60min	-	351
		650°C, 10°C/min, 60min	-	151
		10°C/min, 60min	-	

(continua)

(conclusão)

Tabela 10 - Área de superfície BET em BC de microalgas (continuação).

Autor	Microalga	Condições da pirólise	Ativação	Área de Superfície BET (m ² .g ⁻¹)
CHOI <i>et al.</i> (2020)	<i>Spirulina sp.</i>	350°C, 120 min	-	0,31
		550°C, 120 min	-	1,55
		750°C, 120 min	-	2,63
CHAKRABORTY <i>et al.</i> (2020)	Microalga silvestre (estação de tratamento)	400°C, 10°C/min, 120min	ativação térmica 900°C, 60min	21,00
PILONI <i>et al.</i> (2021)	<i>Spirulina platensis</i>	300°C, 20min	-	2,2
		300°C, 20min	ativação térmica 400°C, 4h	4
Este trabalho	<i>Spirulina maxima</i>	310°C, 10°C.min ⁻¹ , 60 min	-	12,5
		310°C, 10°C.min ⁻¹ , 60 min	Ativação CO ₂ , 350°C, 2h	162,02

Fonte: próprio autor

O mesmo ocorreu com o BC de *S. maxima* deste trabalho quando ativado com CO₂ que, apesar da melhora da área BET para 162,02 m².g⁻¹, apresentou perda da massa inicial de BC de 49%. Logo, apesar da melhora da área de superfície, os métodos utilizados para o aumento deste parâmetro acarretam na baixa expressiva do rendimento em BC. Portanto, a finalidade do uso do BC, baixa ou alta porosidade, é o parâmetro mandatório para determinar o processamento de produção de BC de maior área superficial ou não.

Por fim, pode-se notar que área de superfície varia bastante pela temperatura de pirólise e de espécie para espécie, justamente pela composição metabólica ser única para cada espécie ou tipo de cultivo. O BC de lodo ativado, biomassa não-lignocelulósica, produzido por Zhang *et al.* (2019) apresentou 81,35 m².g⁻¹ de área, saltando para 239,82 m².g⁻¹ para o mesmo BC ativado com CO₂ e 907,95 m².g⁻¹ para o BC ativado com KOH.

O resíduo de madeira convertido em BC por Kastner *et al.* (2012) possui área de 1137 m².g⁻¹, enquanto que o BC de resíduo de madeira produzido por Dehkhoda; West e Ellis (2010) mostrou uma área de apenas 2,74 m².g⁻¹. Já o BC de faia (árvore de nome científico *Fagus sylvatica*) produzido por Narowska *et al.* (2019), apresentou uma área superficial BET de 72 m².g⁻¹. A área de superfície do

BC de casca de laranja produzido por Lathiya, Bhatt e Maheria (2018) foi de $44 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, no entanto, o BC sulfatado apresentou uma densidade elevada de grupos SO_3H na superfície e foi capaz de converter 91,68% do óleo de milho em biodiesel. O mesmo ocorreu com Dekhoda, West e Ellis (2010) que, apesar da baixa área de superfície do BC de resíduo de madeira, o BC sulfatado foi capaz de converter 88% do óleo de canola em biodiesel.

Outros suportes catalíticos de baixa área superficial também tem sido aplicados com eficiência na produção de biodiesel, como o Nb_2O_5 de área $169,1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e Al_2O_3 de área $31,7 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ utilizados por Conceição *et al.* (2017) e Carvalho *et al.* (2017), respectivamente, como suportes catalítico em reações de TE.

5.2 Pré-tratamento químico (ativação química em uma etapa) da biomassa de *S. maxima* para a produção de BC

Esta etapa do trabalho estudou o comportamento da degradação térmica da biomassa de *S. maxima*, avaliando os pré-tratamentos com agente químicos (ativadores químicos) que aumentassem a porosidade do BC de *S. maxima*, até então produzido com baixa área de superfície e volume de poros. Assim procurou-se estabelecer quais variáveis do tratamento da biomassa com agentes químicos favoreceu o maior rendimento em BC e porosidade.

Os tratamentos ocorreram com a impregnação dos agentes químicos na biomassa precursora do processo da pirólise (pirólise em uma etapa) conforme o planejamento experimental L9 de Taguchi variando o tipo de ativador, razão mássica de impregnação (ativador/biomassa) e temperatura de impregnação ($^{\circ}\text{C}$) e analisando a área superficial ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) e a adsorção do corante Azul de Metileno ($\text{mg}.\text{g}^{-1}$).

Os experimentos da matriz L9 foram feitos em duplicata, no entanto, dada a dificuldade do controle da reação e a limitada quantidade de biomassa disponível, alguns experimentos foram de difícil recuperação após pirólise, para os resultados do estudo são apresentados sem a duplicata. A Tabela 11 apresenta a matriz experimental e os resultados das variáveis respostas: área superficial específica ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) e adsorção de Azul de Metileno ($\text{mg}.\text{g}^{-1}$) referentes a cada condição experimental.

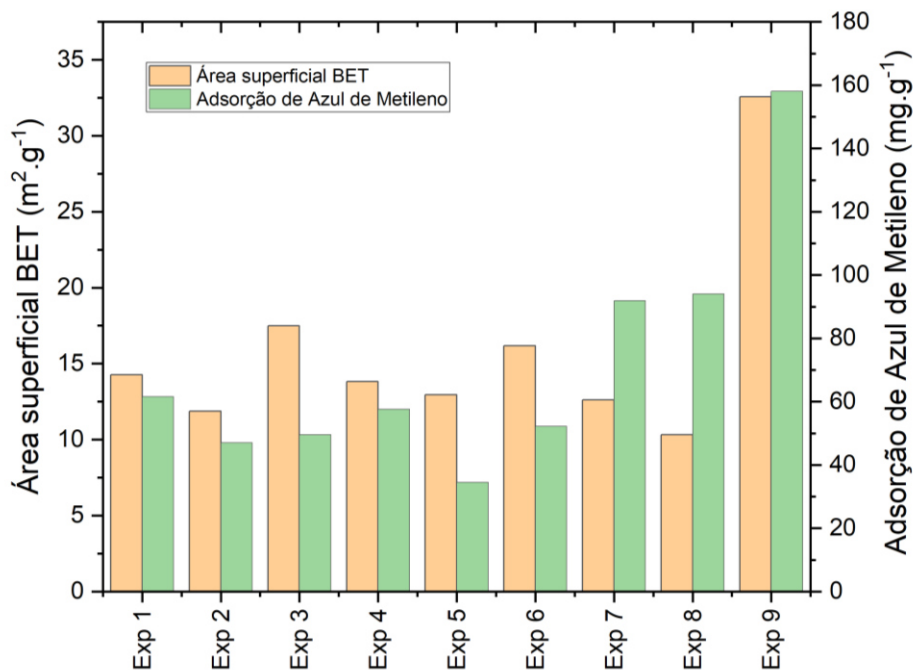
Tabela 11 – Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento experimental L9 de Taguchi utilizado no pré-tratamento da biomassa de *S. maxima* para produção de BC.

Experimento	Ativador químico	Percentual ativador (% m/m)	Temp. de impregnação (°C)	Variável resposta	
				Área superficial BET ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Adsorção de Azul de Metileno ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	(1) H_3PO_4	(1) 10	(1) 25	14,26	61,58
2	(1) H_3PO_4	(2) 50	(2) 50	11,87	46,95
3	(1) H_3PO_4	(3) 75	(3) 80	17,49	49,58
4	(2) ZnCl_2	(1) 10	(2) 50	13,81	57,55
5	(2) ZnCl_2	(2) 50	(3) 80	12,96	34,49
6	(2) ZnCl_2	(3) 75	(1) 25	16,17	52,14
7	(3) KOH	(1) 10	(3) 80	12,62	91,91
8	(3) KOH	(2) 50	(1) 25	10,33	94,01
9	(3) KOH	(3) 75	(2) 50	32,57	158,08

Fonte: Próprio autor

As variáveis respostas área de superfície e adsorção do corante foram plotados em um gráfico de barras e apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Resultados variáveis resposta do pré-tratamento da biomassa de *S. maxima* para produção de BC.



Fonte: próprio autor

Em uma análise geral dos resultados da análise BET (Tabela 11 e Figura 23), os pré-tratamentos da biomassa não resultaram em grande variação da área

superficial do BC, com exceção do experimento 9 que apresentou um valor maior em relação aos demais. Em específico, a alteração do tipo de ativador químico não provocou efeito significativo sob a área superficial do BC, sendo o percentual e temperatura os principais fatores que modificaram a superfície do BC.

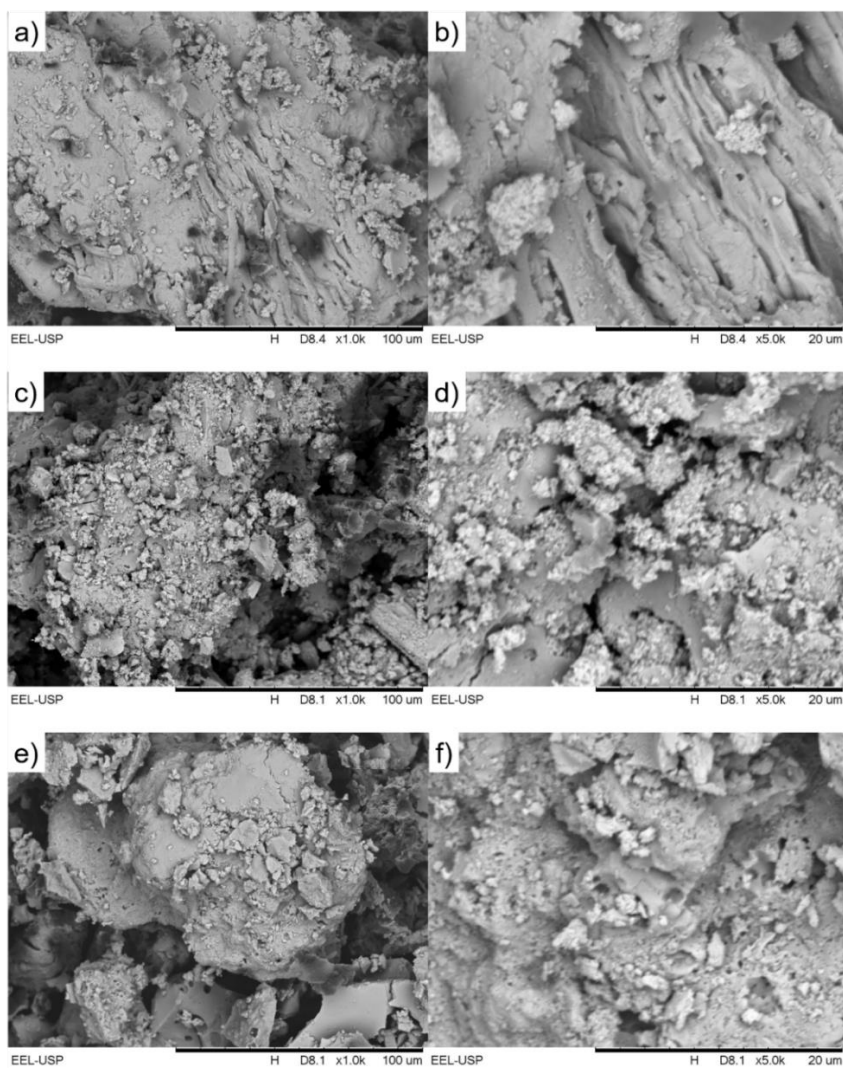
De outro modo, os resultados em adsorção do corante Azul de Metileno não foram diretamente proporcionais com o aumento da área superfície, como para os ensaios 1 e 3 (impregnados com H_3PO_4) que apresentou um aumento na área de superfície (de $14,26 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para $17,49 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$), porém, foi observado uma queda na adsorção do corante de $61,58 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ para $49,58 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ (Figura 23) porventura do aumento do percentual do ativador no pré-tratamento da biomassa que resultou na maior inclusão de grupos funcionais na superfície do BC.

No entanto, os ensaios 7, 8 e apresentaram maior adsorção do corante, sendo o ensaio 9 o que apresentou os maiores valores de área superficial e de adsorção do corante. Também é possível observar que, apesar das amostras terem valores de área aproximados, nos ensaios 2, 5 e 8 o tipo de ativador utilizado influenciou no efeito da adsorção pelo BC, eventualmente dado pela modificação dos grupos funcionais da superfície, mudando o sítio de adsorção do BC. Logo, o KOH parece favorecer a adsorção do corante enquanto que o H_3PO_4 e $ZnCl_2$ interferem de maneira negativa nos sítios de adsorção.

Na Figura 24 são apresentadas as imagens de microfotografia das superfícies dos BCs obtidos com o pré-tratamento químico, onde é possível verificar a modificação morfológica da superfície do BC após o processo pirolítico.

Pelas microfotografias de MEV, observa-se que o BC tratado com H_3PO_4 (Figura 24 A e B) é predominantemente irregular com aberturas ao longo da superfície e sulcos paralelos, destacados na Figura 24 B, demonstrando as fissuras ocasionadas pelo agente ativador, e microcavidades ao longo da superfície. Enquanto que, para o BC tratado com $ZnCl_2$ (Figura 24 C e D) o material se mostra mais desintegrado com poucas estruturas inteiriças. Também é possível notar a superfície completamente irregular deste BC com formas irregulares e grande número de aberturas na superfície. Já o BC tratado com KOH (Figura 24 E e F), apesar de também apresentar grande formas irregulares, é possível notar na Figura 24 F a existência de um grande número de microcavidades ao longo da superfície.

Figura 24 – MEV dos BCs de *S. maxima*: ativado com H_3PO_4 (a) ampliação de 1000x e (b) 5000x; ativado com $ZnCl_2$ (c) ampliação de 1000x e (d) 5000x; ativado com KOH (e) ampliação de 1000x e (f) 5000x



Fonte: Próprio autor

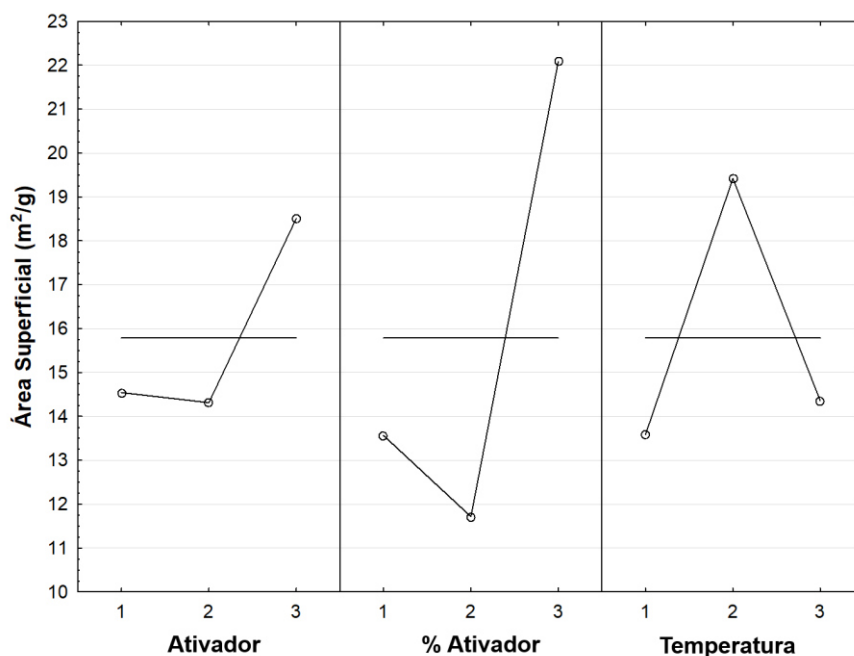
5.2.1 Análise estatística

5.2.1.1 Efeito dos fatores para a área superficial específica ($m^2 \cdot g^{-1}$)

O gráfico de efeitos para a área superficial do BC de *S. maxima* é apresentado na Figura 25. Pela análise do gráfico de efeitos, observa-se que o percentual de ativador no pré-tratamento da biomassa (parâmetro B) mostra ser a variável mais significativa para o aumento da área superficial visto a amplitude da reta formada entre o ponto máximo e as médias das médias (eixo central do gráfico

de efeitos), ou seja, quanto maior a amplitude entre os níveis deste parâmetro, maior é influência sobre a variável resposta estudada. Isto é confirmado pela tabela ANOVA (Tabela 12) onde apenas o fator A foi significativo (F-test = 2,37).

Figura 25 - Gráfico de efeitos principais para as médias de área de superfície do pré-tratamento químico da biomassa para produção de BC.



Fonte: Próprio Autor

Com significância menor, a temperatura do pré-tratamento (parâmetro C) tem menor efeito sobre o aumento da área superficial. O intervalo de temperatura apresentou uma possível faixa de temperatura preferível visto que os extremos de temperaturas estudadas (25°C e 80°C) tiveram menor efeito, em contrapartida, a temperatura de 50°C (nível 2) foi responsável por aumentar a área de superfície do BC.

Por fim, o ativador químico (parâmetro A) mostrou ter pouca influência sobre a área de superfície quando utilizados H_3PO_4 e $ZnCl_2$. No entanto, o uso de KOH (nível 3) mostrou ter um efeito sobre esta variável resposta sendo o mais indicado para o aumento da área superficial do BC. Porém, o efeito pode ser considerado modesto por conta do valor do teste-F de 0,43.

Tabela 12 - ANOVA para as médias de área de superfície do pré-tratamento químico da biomassa para produção de BC.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
A	33,3446	2	16,67230	0,430848	0,698886
B	183,2169	2	91,60845	2,367358	0,296969
C	60,2514	2	30,12570	0,778512	0,562268
Erro	77,3930	2	38,69650		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio Autor

Assim, segundo o gráfico de efeitos, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta área de superfície específica ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) segue a seguinte combinação de fatores:

- Fator A (Ativador químico) = nível 3 (KOH)
- Fator B (Percentual do ativador) = nível 3 (75% m/m)
- Fator C (Temperatura) = nível 2 (50°C)

Logo, é sugerido que o pré-tratamento da biomassa seja feito com o uso de KOH com o percentual de 75% m/m em temperatura em nível médio de 50°C. Em variável codificada o ajuste sugerido é 3,3,2. Este ajuste corresponde ao experimento 9 da matriz experimental, não sendo necessária a execução de um experimento confirmatório. Pela ANOVA (Tabela 12) o efeito dos fatores diminuiu na seguinte ordem: Percentual de ativador > Temperatura > Ativador.

De modo geral, as amostras não tiveram um ganho significativo da área de superfície quando comparado com o BC produzido sem o pré-tratamento da biomassa antes do processo pirolítico (item 5.1.2). Como visto, o BC produzido sem tratamento apresentou área superficial de $12,5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ enquanto que a média geral dos BCs com pré-tratamento foi de $15,79 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, um ganho de área consideravelmente baixo. Apesar do maior aumento de área obtido no ensaio 9, o ganho de área não justifica a realização do pré-tratamento pois em processos de ativação química são esperados ganhos que atinjam mais de $100 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ de área superficial, sendo considerado BC ativo quando atingem $1500 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (PATRA *et al.*, 2021).

Como explicam Tan *et al.* (2017) e Balajii e Niju (2019), em alguns casos a ativação química é agressiva suficiente para destruir as estruturas porosas do BC, bem como, para desintegrar os poucos poros BC de microalgas, podendo diminuir a área de superfície. O que explica o baixo desenvolvimento de área superficial

obtido neste estudo em particular, que pode ser relacionada ao fato de a composição da biomassa não apresentar lignina, que traria maior rigidez estrutural ao BC. Então, o processo de ativação destrói as estruturas dos poros, não desenvolvendo mais estruturas porosas.

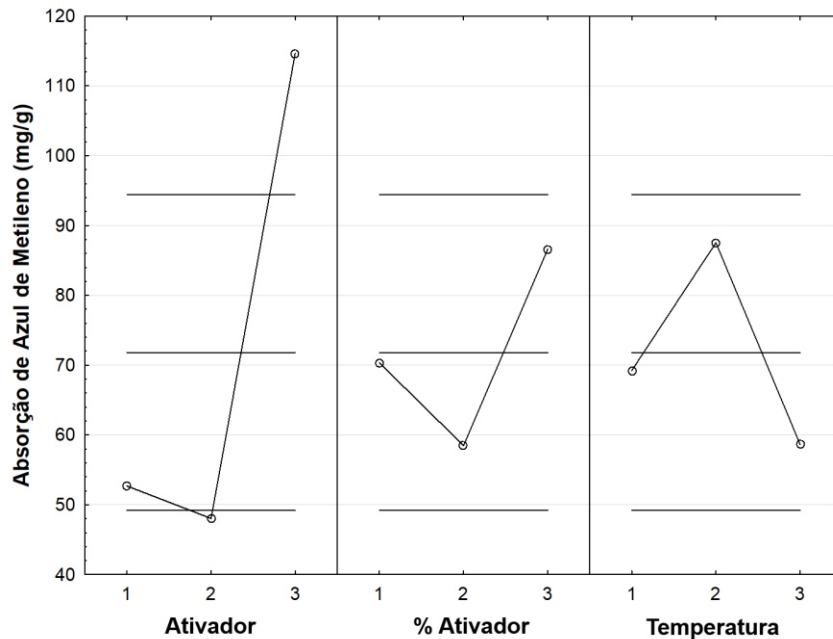
5.2.1.2 Efeito dos fatores para a adsorção de Azul de Metileno (mg.g^{-1})

Diferentemente da resposta em área superficial, o tipo de agente ativador teve um efeito expressivo na adsorção do corante pelo BC tratado. Como visto, as condições experimentais 7, 8 e 9 (impregnadas com KOH) apresentaram a maior adsorção do corante, mas nem sempre acompanhado da melhora da área superficial. O gráfico de efeitos para adsorção de azul de metileno é apresentado na Figura 26.

Pela análise do gráfico de efeitos observa-se que o tipo de ativador (parâmetro A) tem a maior amplitude entre os pontos de máximo e mínimo, mostrando ser o principal fator que altera a característica de adsorção do BC. Confirmado pela tabela ANOVA (Tabela 13) com o maior valor do teste F (F-test = 10,8221). O gráfico de efeitos para a adsorção do corante demonstra a maior capacidade de adsorção pelos BCs impregnados com KOH (parâmetro A).

O percentual do ativador (parâmetro B) e a temperatura (parâmetro C) não mostraram influência significativa na modificação dos sítios de adsorção do BC (F-test = 1,5592 e F-test = 1,6691, respectivamente). Para mais, a alta temperatura do pré-tratamento em 80°C (nível 3) afeta negativamente a capacidade de adsorção pelo BC muito provável que a temperatura aumenta em demasia a degradação da biomassa, e, novamente, indicando uma região ótima da temperatura de trabalho, onde a temperatura de 50°C (nível 2) foi responsável por aumentar a capacidade adsorção do BC. Enquanto que a adsorção decai conforme o percentual de ativador utilizado aumentou de 10% para 50%, porém, uma melhora significativa da adsorção é observada quando aumentado o percentual para 75%. Possivelmente, devido a algum efeito sinérgico não observável entre os fatores.

Figura 26 - Gráfico de efeitos principais para as médias de adsorção de azul de metileno pelo BC de pré-tratamento químico da biomassa.



Fonte: Próprio Autor

Tabela 13 - ANOVA para as médias de adsorção de azul de metileno pelo BC de pré-tratamento químico da biomassa.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
A	8297,60	2	4148,80	10,8221	0,0846
B	1195,49	2	597,74	1,5592	0,3907
C	1279,74	2	639,87	1,6691	0,3747
Erro	766,73	2	383,37		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio Autor

Assim, segundo o gráfico de efeitos, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta adsorção de azul de metileno (mg.g^{-1}) segue a seguinte combinação de fatores:

- Fator A (Ativador químico) = nível 3 (KOH)
- Fator B (Percentual do ativador) = nível 3 (75% m/m)
- Fator C (Temperatura) = nível 2 (50°C)

Assim como para a variável resposta em área superficial, é sugerido também que o pré-tratamento da biomassa seja feito com o uso de KOH com o percentual de 75% m/m em temperatura amena de 50°C para maximiza a adsorção do corante pelo BC. Em variável codificada o ajuste sugerido é 3,3,2,

correspondente ao experimento 9 da matriz experimental, não sendo necessária a execução de um experimento confirmatório. Pela ANOVA o efeito dos fatores diminuíram na seguinte ordem: Ativador > Temperatura > Percentual de ativador.

De modo geral, as amostras de BC de biomassa pré-tratadas com KOH apresentaram maior capacidade de adsorção do corante, presumivelmente por modificar o sítio de adsorção da superfície do BC tal como não ocorre pelos agentes H_3PO_4 e $ZnCl_2$, bem como o melhor desenvolvimento de meso e microporos. No entanto, algumas condições experimentais mostraram resultados eficientes na adsorção do corante. A média de adsorção do corante pelos BCs foi de $71,81 \text{ mg.g}^{-1}$, adsorção efetiva quando comparado a bons resultados de adsorção na literatura como a adsorção do corante azul de metileno de aproximadamente 40 mg.g^{-1} pelo compósito de Nb_2O_5 /xerogel de carbono seco em spray dryer (DE MORAES *et al.*, 2020), de aproximadamente 60 mg.g^{-1} pelo óxido $Nb_2O_5.nH_2O$ (DE MORAES *et al.*, 2018), de $7,84 \text{ mg.g}^{-1}$ pelo serragem de madeira (BOUYAHIA *et al.*, 2023) e de $191,07 \text{ mg.g}^{-1}$ pelo BC (mistura de papelão e biossólidos derivados de biodigestão) (ZUHARA; PRADHAN; MCKAY, 2023). Sendo, então, o BC de *S. maxima* um adsorvente em potencial para remoção de corantes de águas residuais de indústria têxtil.

5.3 Preparo e seleção do catalisador heterogêneo de BC - Esterificação heterogênea de ácido palmítico

As reações de esterificação do ácido palmítico, um precursor de biodiesel, serviram como uma avaliação preliminar do poder catalítico dos catalisadores baseados em BC. A análise preliminar auxiliou o prospecto de melhorias e a solucionar impedimentos na utilização dos BCs impregnados como catalisador heterogêneo na esterificação do precursor de biodiesel. Nesta análise preliminar de seleção do suporte a base carbono também foram testados outros carvões para efeito de comparação e controle. Foram realizados ensaios com carvão ativado comercial (CAC), hidrocarvão (HC) da biomassa de *S. maxima*, bagaço de malte e bagaço de lúpulo, e também com xerogel do compósito Nb_2O_5 /tanino.

5.3.1 Teste preliminar com BC de *S. maxima* impregnado

As reações foram feitas em duplicata, ou triplicata quando apresentou variação significativa do resultado, seguindo a metodologia e parâmetros apresentados no Item 4.6.. Nesta etapa do trabalho, buscou-se estabelecer o método de impregnação, catalisador impregnado e uma série de tratamentos do BC que favorecessem o aumento da conversão do ácido graxo. Os resultados em percentual de conversão do ácido palmítico utilizando os BCs de *S maxima* são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados da conversão na reação de esterificação do ácido palmítico pelos catalisadores de BC de *S. maxima*.

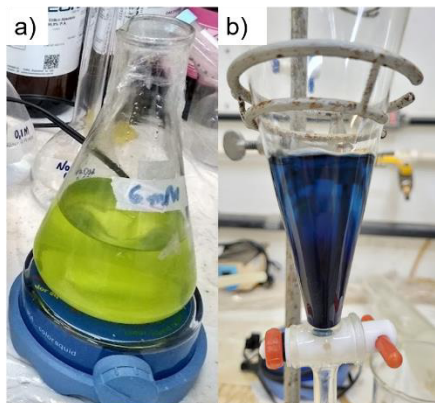
Suporte	Fase ativa	Método de impregnação	% Conversão (%m/m)
Sem suporte	HPA-Mo	-	93,49
Sem suporte	ZnCl ₂	-	9,31
BC	HPA-Mo 30% (m/m)	Umidade Incipiente	33,34
BC	ZnCl ₂ 30% (m/m)	Exc. Solvente	0,33
BC	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	5,48
BC	HPA-Mo 10mM	Exc. Solvente	7,28
BC	HPA-Mo 15mM	Exc. Solvente	4,8
BC ativação ZnCl ₂	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	2,01
BC ativação H ₃ PO ₄	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	1,26
BC Neutralizado	HPA-Mo 2mM	Exc. Solvente	0,02
BC Neutralizado	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	3,17
BC Neutralizado	HPA-Mo (60mg - dado pelo volume de poros)	Exc. Solvente	1,19
BC Neutralizado Calcinado 350°C	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	5,61
BC Neutralizado Calcinado 500°C	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	2,98

Fonte: Próprio autor

No geral, é visto na Tabela 14 que os resultados em conversão em ésteres foram baixos para praticamente todos os empregos do BC impregnado.

Apesar da conversão mais alta nas reações com o BC impregnado via umidade incipiente, os ensaios apresentaram uma coloração azul no meio reacional. A coloração é correspondente ao HPA-Mo não fixado no BC. A Figura 27 B apresenta o meio reacional antes da purificação dos ésteres de uma das amostras reagidas com BC impregnado via umidade incipiente.

Figura 27 – Redução do HPA-Mo em óxido de molibdênio: (a) Solução de HPA-Mo antes da etapa de impregnação (b) Meio reacional ao término da reação de esterificação com o BC impregnado via umidade incipiente: coloração azul resultante do HPA-Mo não fixado e decomposto.



Fonte: Próprio Autor

No entanto, o HPA sólido e a solução de HPA possuem coloração amarela (Figura 27 A). A coloração azul observada (Figura 27 B) é devido a redução do composto de HPA, que se decompõe em óxido de molibdênio - redução do Mo(VI) para Mo(V) (KOZHEVNIKOV, 1998; NARKHEDE; SINGH; PATEL, 2015), ou seja, o composto se decompõe e não retém a estrutura de Keggin do HPA-Mo. Visto o comportamento de desprendimento do catalisador na impregnação via umidade incipiente, esse método foi descartado no desenvolvimento do catalisador heterogêneo de BC.

Ademais, o uso do $ZnCl_2$ puro ou impregnado no BC (acidez superficial de $2,48 \text{ mmol H}^+ \cdot \text{g}^{-1}$) não se mostraram promissores na reação de esterificação e seu uso também foram desconsiderados para o estudo exploratório subsequentes.

Em todos os usos de BC impregnado com HPA-Mo as conversões se mostraram baixa quando comparados com o uso do HPA-Mo sem suporte (puro). Em 4 h de reação, foi alcançado 93,49% de conversão utilizando o HPA-Mo sem suporte, enquanto que os resultados com o BC impregnado não ultrapassaram 7,28% de conversão (acidez superficial do BC-HPA-Mo 5mM de $3,615 \text{ mmol H}^+ \cdot \text{g}^{-1}$). Ao variar a concentração da solução de impregnação (5, 10 e 15 mM) é observável uma provável saturação dos poros pelo HPA em maiores concentrações, visto que a conversão decai com o aumento da concentração da impregnação.

No estudo realizado por Alcañiz-Monge et al. (2013), a conversão do ácido palmítico atingiu o patamar de conversão de 76% (6 h de reação a 60°C com metanol na razão molar 1:97) utilizando 200 mg de CA de bambu como suporte para o HPA-Mo (44% m/m, acidez superficial 288 $\mu\text{mol HNO}_3\cdot\text{g}^{-1}$). A conversão mais alta conseguida pelos autores são atribuídas pela grande área de superfície do carvão de bambu utilizada (1990 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) que aumenta a proporção de sítios ácidos. No entanto, houve um decréscimo expressivo da conversão no ciclo de reutilização devido a lixiviação do HPA.

Em outro estudo, Alcañiz-Monge *et al.* (2018) exploraram o uso da zircônia (ZrO_2) impregnada com HPA-W (10-50% m/m) na reação de esterificação do ácido palmítico (metanol na razão molar 1:97 em 6 h de reação a 60°C). A zircônia apresenta área superficial bem mais baixa, 164 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, porém a conversão com 300 mg do catalisador carregado com 30% em massa atingiu conversão de 95% de conversão e tiveram menor perda de atividade catalítica por lixiviação do HPA em ciclos de reutilização. Segundo os autores, a maior conversão é explicada pelo aumento da área superficial após a impregnação (365 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) resultante da oxidação da zircônia pelo HPA durante a calcinação do catalisador.

No estudo apresentado por Prado *et al.* (2018), foi avaliada a esterificação do ácido láurico, um ácido graxo de cadeia menor ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$), com metanol (razão molar 1:50) a 70°C por 10 h catalisada por BC de resíduo de madeira (candeia sem óleo essencial) impregnada com HPA-Mo. Apesar da grande área superfície do BC de madeira ativado com K_2CO_3 (711 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), a esterificação não ultrapassou 80% de conversão. Segundo os autores, embora haja uma baixa carga do HPA introduzida no BC, resultando na baixa acidez, o suporte desempenha um papel fundamental na reação e pode contribuir para a obtenção de uma alta taxa de conversão.

Uma alternativa de melhoria de porosidade, ativação por H_3PO_4 e ZnCl_2 estudado no Item 5.2, também não trouxeram aumento da conversão. A ativação por KOH não foi considerada para essa etapa do estudo pelos grupos alcalinos presentes na superfície do BC.

Dando seguimento aos testes, foi percebido que a solução filtrada após a impregnação dos BCs apresentava uma leve coloração azulada, logo uma possível redução do HPA-Mo também estava ocorrendo. Ao medir o pH da mistura do BC, ainda não impregnado, com água deionizada, a solução apresentou pH de 10,37,

indicando um caráter alcalino do BC. Então, passou-se a realizar a neutralização do BC durante a etapa de lavagem, afim de neutralizar o caráter alcalino do BC e evitar a redução do HPA-Mo durante a impregnação. Foi adicionada solução de HCl 0,1M até pH=7). No entanto, a solução filtrada ainda mostrou coloração levemente azulada após a impregnação, e como pode se observar na Tabela 14, as conversões do ácido graxo utilizando o BC neutralizado ainda permaneceram baixas. A acidez superficial do BC neutralizado e impregnado com HPA 5mM foi de 0,55 mmol H⁺.g⁻¹, enquanto que, inicialmente, a acidez superficial do BC neutralizado foi de 0,24 mmol H⁺.g⁻¹.

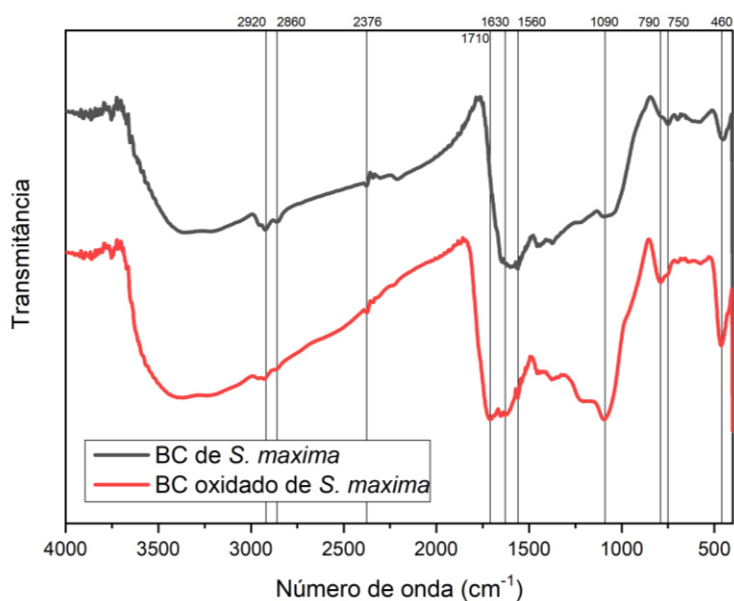
5.3.2 Teste preliminar com BC de *S. maxima* oxidado e impregnado

A hipótese final foi que o BC da *S. maxima* apresentava grupos funcionais de superfície capaz de reduzir o HPA-Mo. Assim, foram realizadas a lavagem do BC com agente oxidantes fortes para eliminar possíveis grupos redutores e grupos funcionais básicos presentes na superfície: primeiramente sendo realizada a oxidação com H₂O₂ e, posteriormente com HNO₃.

Essa modificação da superfície é apresentada no espectro de FITR apresentado na Figura 28. Apesar da complexidade dos grupos de superfície e dificuldade de interpretação, principalmente pela sobreposição de picos, alguns grupos funcionais na superfície dos BCs podem ser identificados.

Os grupos funcionais do BC de *S maxima* foram bem intensos em aproximadamente: 3600-3300 cm⁻¹, 1710 cm⁻¹, 1560 cm⁻¹, 1090 cm⁻¹, 790 cm⁻¹ e 463 cm⁻¹. A banda larga entre 3600-3300 cm⁻¹ apresenta as vibrações dos grupos –OH (hidroxila em carboxílicos, fenóis ou água absorvida) (TRAN *et al.*, 2020).

Figura 28 – Espectro de FTIR do BC de *S. maxima* e do BC de *S. maxima* oxidado (20% m/m).



Fonte: Próprio Autor

A banda em torno de 1700 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O do grupo -COOH revelando a presença de ácido carboxílico (FU *et al.*, 2013). Picos no comprimento de onda de 1560 cm^{-1} , indicam o alongamento C=C do hidrocarboneto poliaromático. (TANG *et al.*, 2020). As bandas próximas a 1085 cm^{-1} correspondem as variações de flexão/deformação de alcenos sugerindo que a camada de carbono do BC é aromática e estável (GE *et al.*, 2020). Os comprimentos de onda entre 1000 e 400 cm^{-1} no espectro FTIR correspondem as cinzas do BC, que indicam a maioria dos componentes minerais (HUSILLOS RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ-RAMÍREZ; BLANCO-VARELA, 2016). As cinzas de Si geram picos nas bandas 463 cm^{-1} e 1073 cm^{-1} e estão relacionadas à vibração de flexão Si-O-Si (DAS; ROUT, 2022), assim sobrepondo e gerando a banda larga entre 1087 cm^{-1} e 1073 cm^{-1} .

Portanto, o processo de oxidação do BC com H_2O_2 e HNO_3 demonstra a remoção/conversão efetiva dos resíduos pirolíticos da superfície evidenciando as cinzas formadas na estrutura do BC. Essa modificação da superfície também é vista com a emergência dos picos em 1700 cm^{-1} correspondente ao ácido carboxílico, bem como a diminuição das bandas entre 2960 - 2860 cm^{-1} (vibrações de metil e metileno), correspondente a matéria orgânica original preservada, ou seja, matéria orgânica não convertida na pirólise é removida ou reagida no processo de oxidação do BC.

Tabela 15 – Resultados da conversão na reação de esterificação do ácido palmítico pelos catalisadores de BC oxidado de *S. maxima*.

Suporte	Catalisador	Método de impregnação	% Conversão (%m/m)
BC oxidação H ₂ O ₂ 20%	HPA-Mo 5mM (em H ₂ O ₂ 20%)	Exc. Solvente	1,79
BC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 10%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	1,23
BC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 2mM	Exc. Solvente	1,13
BC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	0,46
BC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 30% _{m/m} (em H ₂ O ₂ 3%)	Umidade Incipiente	65,79

Fonte: Próprio autor

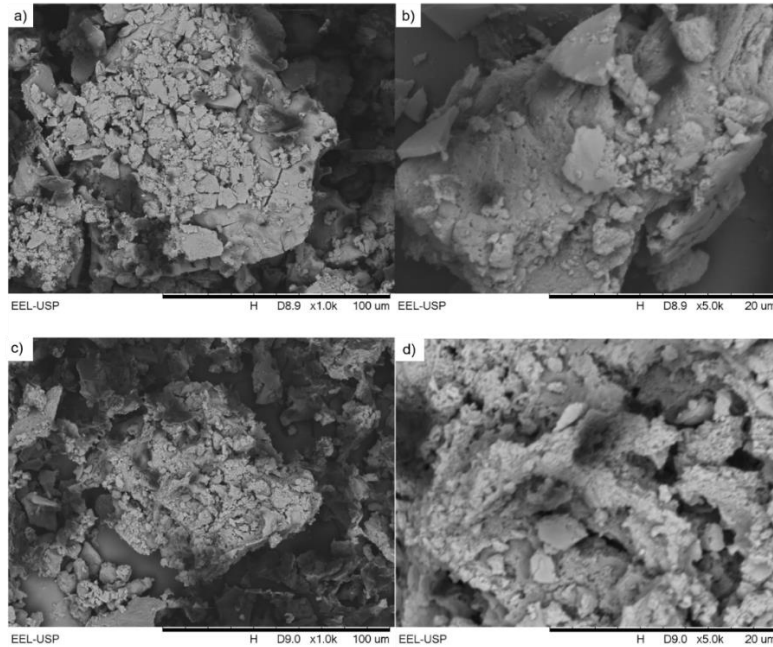
Inicialmente, o BC foi oxidado com os agentes a 10%, (m/m), no entanto, este BC impregnado resultou em conversões do ácido graxo ainda consideravelmente baixas (Tabela 16). Ao aumentar os agentes oxidantes para 20% (m/m), os BC impregnados ainda permaneceram com a conversão em patamar baixo. Apesar da modificação dos grupos funcionais da superfície do BC de *S. maxima* pelo processo de oxidação, o poder de catálise do BC impregnado ainda permaneceu baixo. A acidez superficial do BC-oxi-HPA 2mM foi de 3,48 mmol H⁺.g⁻¹, enquanto que, inicialmente, o BC oxidado apresentou acidez superficial de 1,86 mmol H⁺.g⁻¹.

Na Figura 29 são apresentadas as imagens de microfotografia de MEV das superfícies do BC de *S. maxima* oxidado com H₂O₂ e HNO₃ e do BC de *S. maxima* oxidado e impregnado com o HPA 2 mM.

Pelas microfotografias (Figura 29) é possível verificar que morfologia do BC oxidado possui diferenças com a morfologia apresentada pelo BC sem oxidação (Figura 22). O BC oxidado também demonstra ter uma superfície com grande número de falhas aparentes e formas irregulares. Porém, após a oxidação é possível notar o grande número de microcavidades na superfície na microfotografia ampliada em 5000x (Figura 29 B). O surgimento de tais cavidades podem estar relacionada ao desprendimento das matérias orgânicas não convertidas e resíduos pirolíticos com a ação dos agentes oxidantes. Para o BC oxidado e impregnado (Figura 29 C e D), é possível verificar que não há mudança da morfologia do BC oxidado antes da impregnação (Figura 29 A e B), revelando que a impregnação do HPA a 2 mM não descaracteriza a morfologia inicial do BC oxidado.

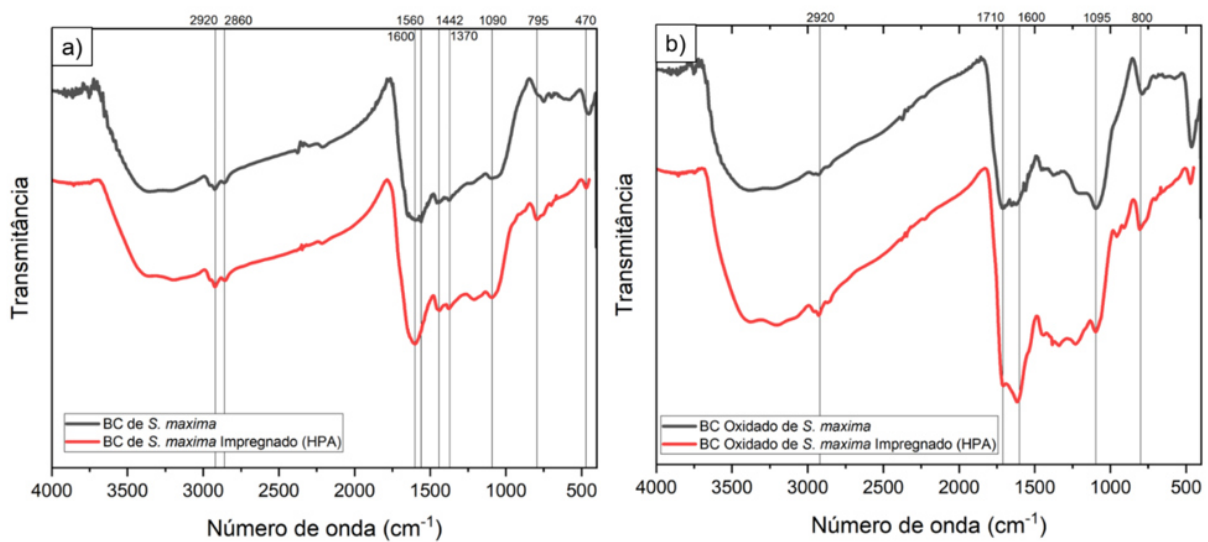
Na Figura 30 são apresentados o espectro de FITR das amostras de BCs impregnados.

Figura 29 - MEV: BC oxidado de *S. maxima* ampliação de (a)1000x e (b) 5000x; BC oxidado de *S. maxima* impregnado com HPA 2 mM ampliação de (c) 1000x e (d) 5000x.



Fonte: Próprio autor

Figura 30 - Espectro FTIR do BC impregnando com HPA de Mo: a) BC de *S. maxima* e b) BC oxidado de *S. maxima*.



Fonte: Próprio autor

Para o HPA de Mo puro, quatro bandas típicas de HPA de estrutura de Keggin podem ser observadas entre 800-1100 cm^{-1} no espectro de FTIR: bandas em 1100-1065 cm^{-1} correspondem ao alongamento da vibração de P-O tetraédrico (átomo de oxigênio e P central); bandas entre 975-954 cm^{-1} corresponde ao átomo de oxigênio terminal ligado a três átomos de Mo (M=O); bandas entre 890-870 cm^{-1} correspondem a vibração do oxigênio compartilhados em canto da ponte (Mo-O-Mo inter octaédrico) e as bandas entre 810-785 cm^{-1} corresponde a vibração do oxigênio compartilhado na borda da ponte (Mo-O-Mo intra octaédrico) (CASTANHEIRO *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2017; HELMI *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2020). Para os BCs impregnados (sem e com oxidação) apresentados na Figura 30 A e B, embora algumas bandas do HPA sejam sobrepostas às bandas do próprio suporte (CASTANHEIRO *et al.*, 2020), as bandas de absorção próximas a 1090 cm^{-1} e 800 cm^{-1} da unidade Keggin (PMo₁₂O₄₀ 3-) estão presentes em ambos espectros, o que indica a presença da estrutura do HPA-Mo na superfície dos BCs e a preservação da estrutura de Keggin. Na região próxima a 1625 cm^{-1} , o pico pode ser atribuído a moléculas de água adsorvidas nas superfícies dos BCs impregnados (CONCEIÇÃO *et al.*, 2017). No entanto, as bandas podem estar sobrepostas com a as vibrações de C=C (HELMI *et al.*, 2021).

5.3.3 Teste preliminar com BC de biomassa extraída (sem óleo) impregnado

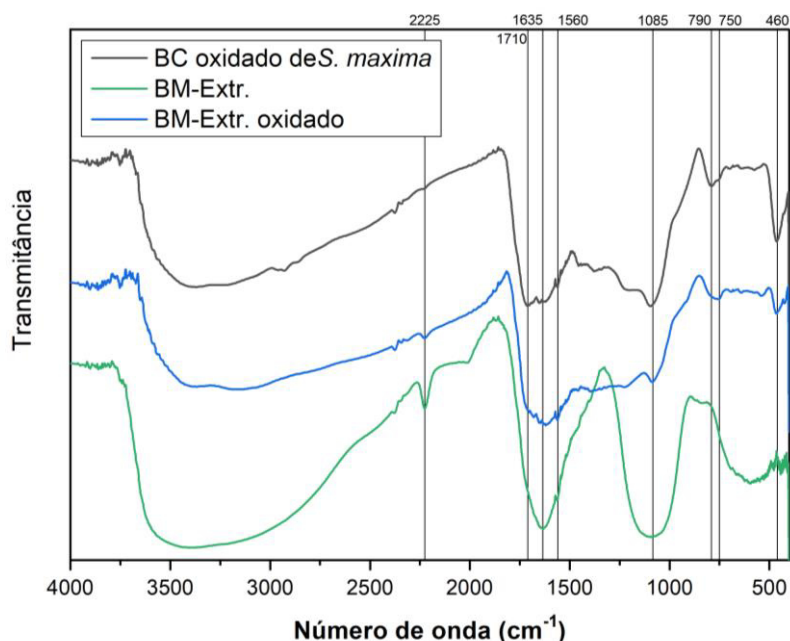
Foi realizado, também, ensaios com o BC da biomassa de *B. braunii* residual da extração de óleo (BM-Extr.) e a média das conversões são apresentadas na Tabela 16. O BC de BM-Extr. também passou por processos de oxidação com H₂O₂ e HNO₃ e seus espectros de FTIR são apresentados na Figura 31.

Tabela 16 – Resultados da conversão na reação de esterificação do ácido palmítico pelos catalisadores de BC da biomassa residual (extração de óleo) de *B. braunii*.

Suporte	Catalisador	Método de impregnação	% Conversão
BC resíduo (s/ óleo) oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 2mM	Exc. Solvente	4,84

Fonte: Próprio autor

Figura 31 - Espectro de FTIR para o BC de *S. maxima* oxidado a 20% (m/m), BC de BM-Extr. (biomassa sem óleo) de *B. braunii* e BC oxidado da BM-extr. de *B. braunii*.



Fonte: Próprio Autor

Ambos BCs oxidados, BC de *S. maxima* e BC de BM-Extr. de *B. braunii*, resultaram em espectros de FTIR semelhantes, com exceção ao pico de intensidade média na banda 2225 cm^{-1} , correspondente ao estiramento $\text{C}\equiv\text{C}$ (alcino) ou estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ (nitrila) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994). Na amostra ainda sem passar pelo processo de oxidação (BC-Extr.) esta banda aparece mais intensa, bem como as bandas em 1631 cm^{-1} (vibração de $\text{C}=\text{O}$ em amidas) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994) e 1087 cm^{-1} sobreposição, em grande parte, pelas vibrações das cinzas e flexão/deformação de alcenos em menor parte. É evidente a diminuição destas bandas no BC após a oxidação (BC BM-Extr. oxidado) onde os picos destas bandas são reduzidos ou inexistentes.

Como visto, o BC de *S. maxima* e o BC de BM-Extr., ambos na forma oxidada, são bastante semelhantes nos grupos funcionais de superfície, demonstrando equivalência no uso de ambos BCs. Quando o BC de BM-Extr. impregnado com HPA foi utilizado na esterificação do ácido palmítico o mesmo apresentou resultados de conversão no mesmo baixo patamar do BC de *S. maxima*. Logo, as mesmas características de baixa conversão foram encontradas para as duas matérias-primas.

5.3.4 Teste preliminar com carvão ativado comercial (CAC)

Os resultados da conversão do ácido palmítico pelo CAC, suporte a base de carbono para comparação e controle, são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados da conversão na reação de esterificação do ácido palmítico pelos catalisadores de CAC.

Suporte	Catalisador	Método de impregnação	% Conversão
CAC	HPA-Mo 30% <i>m/m</i>	Umidade Incipiente	40,98
CAC	HPA-W 30% <i>m/m</i>	Umidade Incipiente	0,98
CAC	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	7,21
CAC	HPA-W 5mM	Exc. Solvente	1,8
CAC ativação H ₃ PO ₄	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	5,41
CAC ativação H ₃ PO ₄	HPA-W 5mM	Exc. Solvente	6,02
CAC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 10%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	13,34
CAC oxidação H ₂ O ₂ 20%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	6,98
CAC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 2mM	Exc. Solvente	10,58
CAC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	10,81
CAC oxidação H ₂ O ₂ /HNO ₃ 20%	HPA-Mo 30% <i>m/m</i> (em H ₂ O ₂ 3%)	Umidade Incipiente	87,83

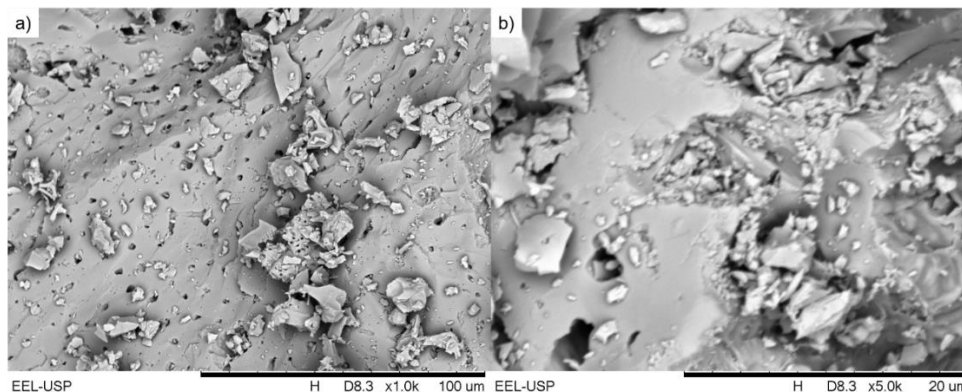
Fonte: Próprio Autor

Assim como para os BCs de *S. maxima*, os CACs impregnados apresentaram o mesmo comportamento na impregnação via umidade incipiente, resultando em meio reacional azulado. Portanto, o CAC/HPA via umidade incipiente também carrega maior quantidade de HPA não fixada e liberada no meio reacional.

De maneira geral, os resultados da conversão utilizando o CAC como suporte catalítico resultaram em baixas conversões do ácido graxo. Todos os métodos de melhoria de porosidade ou modificação de grupos de superfície (ativações e oxidações) aplicados ao BC de *S. maxima* também foram aplicados para o CAC. No entanto, os processos de modificações da superfície do CAC mostraram resultados de conversão em ésteres de moderado a baixo. Uma nova abordagem foi a impregnação do HPA de tungstênio (HPA-W) no CAC, porém, os resultados em conversão foram semelhantes ou inferiores aos resultados obtidos com o HPA-Mo.

Na Figura 32 são apresentadas as imagens de microfotografia de MEV das superfícies dos CAC oxidado com H₂O₂ e HNO₃, onde é possível verificar a morfologia da superfície do CAC.

Figura 32 – MEV do CAC: ampliação de(a) 1000x e (b) 5000x.



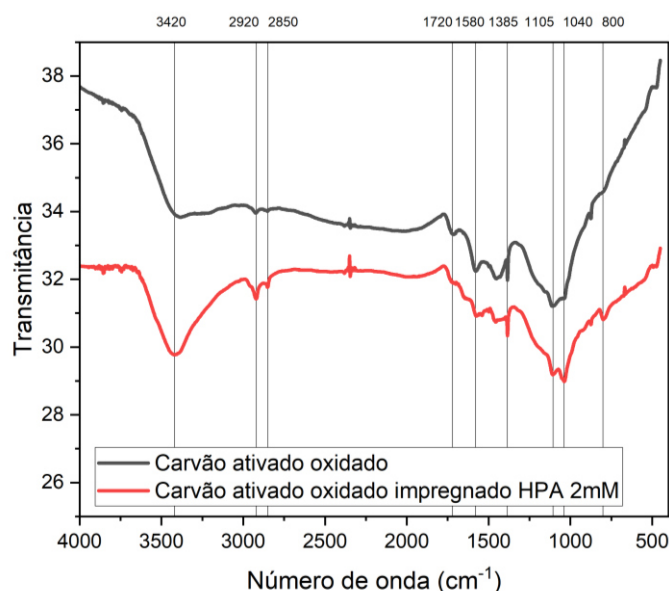
Fonte: Próprio autor

Pelas micrografias (Figura 32), observa-se que o CAC possui uma superfície predominantemente plana com poucas falhas aparentes e formas irregulares. No entanto, é possível notar um certo padrão e grande número de microcavidades que podem ser macroporos uniformemente distribuído pela superfície do CAC. Apesar da aparente numerosidade de macroporos, os resultados do CAC impregnado foram ligeiramente maiores que os alcançados com o BC de *S. maxima* impregnado.

Na Figura 33 é apresentado o espectro de FTIR das amostras de CAC oxidado e CAC oxidado e impregnado.

Para o CAC, o pico largo próximo a 3400 cm^{-1} está associado às bandas do grupo O-H. A banda fraca em 2920 cm^{-1} é atribuída a presença do trecho C-H alifático (CH, CH₂ e CH₃) e a banda próxima 2850 cm^{-1} é atribuído ao alongamento simétrico CH₂ (MOJOUDI *et al.*, 2019). É possível notar que para o CAC impregnado com HPA permanece com o mesmo perfil do CAC. Apenas, com a sobreposição dos picos típicos do HPA imobilizado e da complexa superfície do CAC, porém intensificações em 1100 cm^{-1} (P-O) e em 800 cm^{-1} (Mo-O-Mo intra octaédrico) são notórias.

Figura 33 - Espectro FTIR para (a) o CAC e (b) o CAC impregnando com HPA-Mo.



Fonte: Próprio autor

5.3.5 Teste preliminar com hidrocarvão (HC) impregnado

Os resultados da conversão do ácido palmítico pelos HCs são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados da conversão na reação de esterificação do ácido palmítico pelos catalisadores de HC de diferentes biomassas.

Suporte	Catalisador	Método de impregnação	% Conversão
HC de <i>S. maxima</i>	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	3,32
HC de bagaço de Malte	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	0,56
HC de bagaço de lúpulo	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	0,42

Fonte: Próprio Autor

Pode-se observar que os três HCs propostos não apresentaram conversão significativas. Sendo o HC da biomassa de *S. maxima* o suporte de mais alta conversão, ainda assim, consideravelmente baixa quando comparado às reações realizadas com o BC de *S. maxima* e o CAC.

5.3.6 Teste preliminar com xerogel de carbono impregnado

Os resultados da conversão do ácido palmítico pelo xerogel do compósito N_2O_5 /tanino são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados da conversão na reação de esterificação do ácido palmítico pelos catalisadores de xerogel de carbono.

Suporte	Catalisador	Método de impregnação	% Conversão
Xerogel	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	4,97
Xerogel oxidação H_2O_2 20%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	2,49
Xerogel oxidação H_2O_2/HNO_3 10%	HPA-Mo 5mM	Exc. Solvente	7,66
Xerogel oxidação H_2O_2/HNO_3 10%	HPA-W 5mM	Exc. Solvente	3,34

Fonte: Próprio Autor

Como visto, o xerogel de carbono também apresentou comportamentos semelhantes ao BC de *S. maxima*, solução de filtração com coloração azulada e baixa conversão do ácido palmítico. Assim, as amostras de xerogel também foram oxidadas afim de eliminar grupos redutores da superfície. No entanto, as oxidações do xerogel não resultaram em melhora da conversão. O xerogel oxidado e impregnado com HPA-W, também, resultou em conversão menor que a do xerogel impregnado com HPA-Mo.

5.3.7 Discussões gerais

Como visto, independentemente da origem do BC, os resultados são bastantes semelhantes, baixa conversão apesar da fixação do HPA na superfície do BC.

Segundo Lefebvre, Dupont e Auroux (1995), a acidez do HPA é bastante reduzida após a sua inserção em carvão. Os autores relatam que o CA diminui a força do ácido devido a interação entre o HPA e carvão, que se deve a transferência de elétrons entre o carbono e unidade Keggin, resultando na diminuição da força do ácido. Kozhevnikov (1998) também relata que a força ácida do HPA-W foi bastante reduzida quando carregada em CA. Segundo o autor, carregamentos superiores a 5% (m/m) podem reter a estrutura Keggin no CA, no entanto, com força ácida diminuída.

E de acordo com Alcañiz-Monge *et al.* (2008), a adsorção do HPA ocorre apenas na supermicroporosidade (0.7 - 2 nm), e por consequência do alto tamanho

molecular do HPA, o HPA encontra-se disperso na parede do supermicroporo sem desenvolver qualquer fase cristalina. E conclui, que as concentrações de impregnações devem ser relativamente baixas, pois atingem a saturação rapidamente à medida que a concentração da dissolução do HPA aumenta, diminuindo o volume de microporos.

Em vista disto, a baixa conversão atingida nas reações de esterificação do ácido palmítico pelos BCs é consequência desta interação entre o HPA e o BC que diminui a força ácido do catalisador heterogêneo proposto neste trabalho. No entanto, como visto, a atividade catalítica do BC de *S. maxima* impregnado na reação de esterificação (em pressão atmosférica) existe, ainda que à uma conversão baixa. Embora essa força ácida do HPA-Mo seja reduzida quando suportado no BC, o poder catalítico pode ser elevado em condições de pressão e temperaturas mais altas que aumenta a frequência de colisão entre os reagentes e o catalisador, bem como a permeação para as cavidades do BC dada a diminuição da viscosidade. Isto posto, a catálise por BC impregnado foi estudada em reator pressurizado (estudo preliminar, do Item 5.4).

5.4 Transesterificação (TE) heterogênea do óleo de macaúba

Tendo o BC lavado, neutralizado e oxidado como o suporte mais adequado para o HPA-Mo nos testes de seleção do suporte, neste estudo preliminar buscou-se explorar a concentração da solução de HPA-Mo (mM) na etapa de impregnação do BC e o percentual do catalisador de BC-HPA-Mo (% m/m) na TE do óleo de macaúba, óleo de propriedades físico-químicas semelhantes ao óleo de microalgas. Para tanto, aplicou-se o planejamento fatorial composto central rotacional 2^2 com repetições no ponto central, definindo como variáveis independentes a concentração de HPA na impregnação (fator A) e o percentual de BC-HPA (fator B). Como variável resposta foi considerada a porcentagem de conversão em ésteres etílicos de ácido graxos (%EE). Os percentuais em ésteres etílicos obtidos na TE foram estimados pelas áreas dos picos de interesse nos espectros de RMN¹H. Os espectros de RMN¹H de cada ensaio são apresentados no APÊNDICE B.

A Tabela 20 apresenta a matriz experimental juntamente com os resultados da variável resposta conversão em ésteres etílicos (%EE) referentes a cada condição experimental do planejamento fatorial.

Tabela 20 – Matriz experimental e resultados obtidos na TE heterogênea do óleo de macaúba.

Ensaio	Variáveis independente e níveis		Variável resposta
	Concentração de impregnação (mM)	Percentual BC-HPA (% m/m)	Conversão em ésteres etílicos (%EE)
1	(-1) 2	(-1) 20	52,74
2	(-1) 2	(1) 40	70,23
3	(1) 10	(-1) 20	59,14
4	(1) 10	(1) 40	58,01
5	(-1,41) 0,34	(0) 30	44,85
6	(1,41) 11,66	(0) 30	44,35
7	(0) 6	(-1,41) 15,86	57,54
8	(0) 6	(1,41) 44,14	56,94
9	(0) 6	(0) 30	57,94
10	(0) 6	(0) 30	57,34
11	(0) 6	(0) 30	57,38

Fonte: próprio autor

Verifica-se que a conversão do óleo em ésteres etílicos apresentou uma variação de 44,35% a 70,23%. A conversão mais alta foi obtida no ensaio 2 com concentração de impregnação em 2 mM e percentual de BC-HPA de 40% (m/m). Por outro lado, os ensaios 5 e 6 apresentaram a menor conversão e foram realizados com o percentual de BC-HPA de 30%, porém, o ensaio 5 utilizou o BC-HPA impregnado em solução de 0,34 mM (nível mínimo) enquanto que o ensaio 6 utilizou o BC-HPA impregnado em solução de 11,66 mM (nível máximo), indicando que a quantidade de HPA no BC é um parâmetro importante para a boa atuação do catalisador de BC. Os dados demonstram que em concentrações baixas não se cria sítios catalíticos suficientes para a reação e enquanto que, em altas concentrações, os microporos do BC de *S. maxima* podem ser saturados (entupidos) pela alta quantidade de catalisador que impede o acesso dos reagentes ao poro, também resultando em baixa conversão. Ademais, as impregnações realizadas com solução de 2-6 mM apresentaram resultados satisfatórios com uma média de 58,80% de conversão do óleo de macaúba.

Na reação de esterificação do ácido palmítico realizada por Alcañiz-Monge, Trautwein e Marco-Lozar (2013), os autores investigaram a concentração de HPA-Mo carregado no BC de bambu ativado. Os autores relatam que a quantidade de sítios ativos aumenta com o HPA carregado até 20-25% (m/m) e diminui com cargas mais altas de HPA, e exemplificam os três principais motivos para a queda da acidez: (i) os prótons ficaram inacessíveis devido ao bloqueio dos poros pelo HPA, (ii) neutralizados por grupos básicos da superfície do suporte, ou (iii) formação de uma cobertura multicamadas de HPA no suporte. Neste caso, o carvão de bambu utilizado possui uma área superficial cerca de duzentas vezes maior que o BC de *S. maxima* utilizado neste trabalho, logo, os poucos poros podem ser rapidamente saturados conforme a carga de HPA é aumentada, fundamentando a queda na conversão em concentrações de impregnação maiores que 6 mM.

Na reação de TE homogênea do óleo de macaúba realizada por Souza *et al.* (2016), a variação da temperatura (90-120°C) foi a variável que mais afetou a conversão, tendo ganhos de conversão nas temperaturas mais altas. A TE do óleo de macaúba realizada em reator PARR 4843 pelos autores a 4,8 bar de pressão e 114°C, por 3 h com o catalisador homogêneo H₂SO₄ (1,3% m/m) atingiu a conversão de 93,3% do óleo.

No sistema contínuo de TE do óleo de macaúba apresentado por Visioli, De Castilhos e Da Silva (2019), o uso de alumina como catalisador heterogêneo demonstrou que o menor tamanho de partícula da alumina (0,85-1 mm) foram os mais eficientes para a produção dos ésteres. A reação realizada em reator tubular utilizando 2 gramas de alumina (210 m².g⁻¹ de área de superfície) e razão mássica 2,5: de metil acetato:óleo a 275°C e 200 bar de pressão por 20 min (tempo de residência) obteve 71,7% de rendimento em ésteres.

A estrutura macroporosa da Amberlyst 15 (31,3 m².g⁻¹ de área de superfície) utilizada como catalisador heterogêneo para a conversão do óleo de macaúba estudado por Pasa *et al.* (2020) foi favorável para a reação de TE. Segundo os autores, a temperatura foi a variável que apresentou maior efeito significativo no resultado da reação. A reação otimizada em reator PARR 4843 com razão molar etanol:óleo 9:1 e 16% (m/m) do catalisador a 130°C e 5,85 bar de pressão por 8 h, apresentou um rendimento em ésteres acima de 85%.

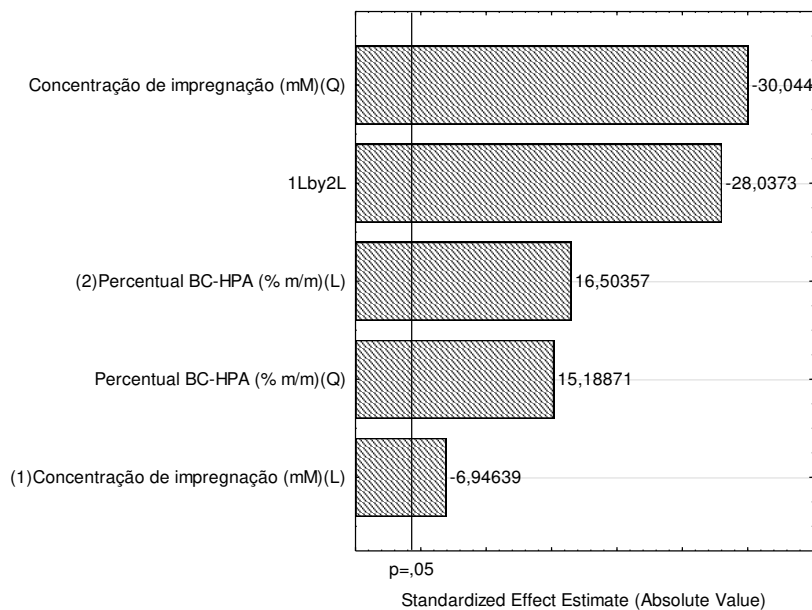
Como visto, as reações com catalisadores heterogêneos apresentam um perfil de conversão do óleo de macaúba menos acentuado quando comparados

com os catalisadores homogêneos, devido principalmente pela retenção de matéria orgânica na estrutura porosa do catalisador resultando na perda de atividade catalítica pelo bloqueio parcial da porosidade, como explicado por Alcañiz-Monge *et al.* (2018).

5.4.1 Análise estatística da conversão em ésteres etílicos

A Figura 34 apresenta o diagrama de Pareto do planejamento experimental. O diagrama de Pareto é uma forma de análise visual da influência que os fatores estudados possuem sobre a variável resposta, cuja a magnitude da barra no diagrama está diretamente ligada ao efeito do parâmetro e a linha transversal às barras representa a magnitude dos efeitos com significância estatística, neste caso, de $p = 0,05$. Desta forma, os efeitos dos parâmetros que ultrapassam a linha transversal são considerados estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95%.

Figura 34 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis independentes sob a variável resposta conversão em ésteres etílicos (%EE) na TE do óleo de macaúba.



Fonte: próprio autor

Dentre os fatores do diagrama de Pareto, todos os parâmetros tiveram influência estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95%. A concentração de impregnação na forma quadrática (Q) teve a maior influência sob

a conversão em ésteres e de forma negativa, ou seja, o aumento no valor deste parâmetro conduziu a uma queda na conversão em ésteres etílicos. O aumento da concentração de impregnação do menor nível (2 mM) para o maior nível (10 mM) ocorre uma queda de 30,04% na variável resposta, indicando que o BC pode ser saturado pela quantidade de HPA dissolvido na solução de impregnação. O parâmetro da concentração de impregnação na forma linear também mostrou o efeito negativo, porém em menor amplitude (-6,95%). Nos estudos de FERREIRA *et al.* (2011), o aumento de HPA imobilizado no CA, também foi observada uma diminuição na atividade catalítica, que foi explicada como algum impedimento no sistema poroso do CA, sendo a amostra com 4,9% em massa de HPA a amostra mais ativa.

O percentual de BC-HPA-Mo, tanto na forma quadrática (Q) e linear (L), tiveram influência estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95% e de forma positiva, efeito oposto da concentração de impregnação. O aumento do percentual de BC-HPA do menor nível (20%) para o maior nível (40%) ocorre um aumento de 16,5% e 15,19% na variável resposta para os parâmetros na forma quadrática (Q) e linear (L), respectivamente. É esperado que a taxa de reação de TE aumente com o maior percentual de catalisador devido a maior área de contato com o HPA disponível.

Também, a interação dos parâmetros (1LbyL2) demonstra um efeito negativo sobre a variável resposta, em que o aumento do percentual de BC-HPA saturado reduz a conversão em 28,04%. Logo, apesar de o percentual de BC-HPA mais alto no meio reacional aumentar a conversão, o aumento dos dois parâmetros resulta na queda de conversão em ésteres.

A ANOVA dos ensaios da matriz experimental é apresentado na Tabela 21. A análise do teste F e p-valor apontam que todos os fatores são estatisticamente significativos e tem efeito sobre a variável resposta.

Com base na análise do teste F, o valor de F calculado ($F_{0,05; 3,2} = 623,24$) é maior que o valor de F crítico ($F_{0,05; 3,2} = 19,16$) tabelado, conforme valor da tabela de distribuição F (MONTGOMERY, 2013), indica que não há falta de ajuste para o modelo proposto e corresponde adequadamente aos dados experimentais. O F da falta de ajuste de 623,24 implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. Portanto, há apenas 0,16% de chance de que uma falta de ajuste

possa ser devido a fatores de ruído, como erros humanos (experimentais) ou erros instrumentais (LATHIYA; BHATT; MAHERIA, 2018).

Tabela 21 – ANOVA para a variável resposta conversão em ésteres etílicos (%EE) para a TE heterogênea do óleo de macaúba.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
X ₁ (Linear)	5,323	1	5,3227	48,2524	0,0201
X ₁ (Quadrática)	99,575	1	99,5746	902,6851	0,0011
X ₂ (Linear)	30,045	1	30,0447	272,3678	0,0037
X ₂ (Quadrática)	25,448	1	25,4480	230,6969	0,0043
X ₁ (L) x X ₂ (L)	86,713	1	86,7133	786,0925	0,0013
Falta de ajuste	206,247	3	68,74885	623,2369	0,0016
Erro	0,221	2	0,1103		
Total SS	497,825	10			

X₁ = concentração de impregnação, X₂ = percentual de BC-HPA, GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; p – Valor-p

Fonte: próprio autor

A partir da análise de regressão foi obtido um modelo representativo do comportamento dos resultados experimentais. O modelo foi obtido pelo Statistica 10 e os dados dos coeficientes de regressão e confecção do modelo são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Coeficientes de regressão para a variável resposta conversão em ésteres etílicos (%EE) para a TE heterogênea do óleo de macaúba.

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t	p
Média	41,66843	1,500166	27,7759	0,001294
X ₁ (Linear)	6,43745	0,165414	38,9172	0,000660
X ₁ (Quadrática)	-0,26245	0,008735	-30,0447	0,001106
X ₂ (Linear)	-0,38151	0,088264	-4,3223	0,049579
X ₂ (Quadrática)	0,02123	0,001398	15,1887	0,004307
X ₁ (L) x X ₂ (L)	-0,11640	0,004152	-28,0373	0,001270

X₁ = concentração de impregnação, X₂ = percentual de BC-HPA, GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; p – Valor-p

Fonte: próprio autor

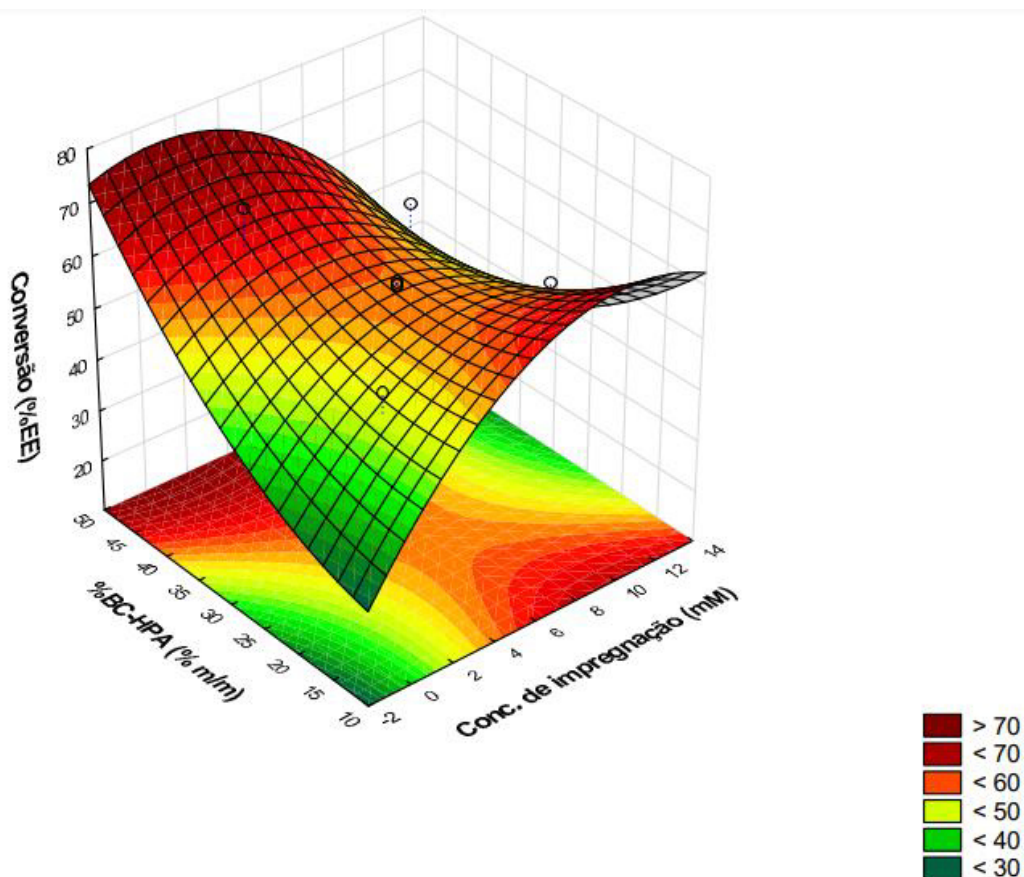
O modelo obtido pela análise de regressão que relaciona a conversão em ésteres etílicos (Y) e as variáveis independentes concentração de impregnação (X₁) e percentual de BC-HPA (X₂) é apresentado na Equação (7).

$$Y = 41,67 + 6,44X_1 - 0,26X_1^2 - 0,38X_2 + 0,02X_2^2 - 0,1164X_1 \cdot X_2 \quad (7)$$

Com o modelo criado, foi possível plotar o gráfico de superfície de resposta e curvas de níveis apresentados nas Figura 35 e Figura 36, respectivamente. A superfície de resposta demonstra a interação entre os fatores concentração de impregnação e percentual de BC-HPA e suas influências na conversão (%EE).

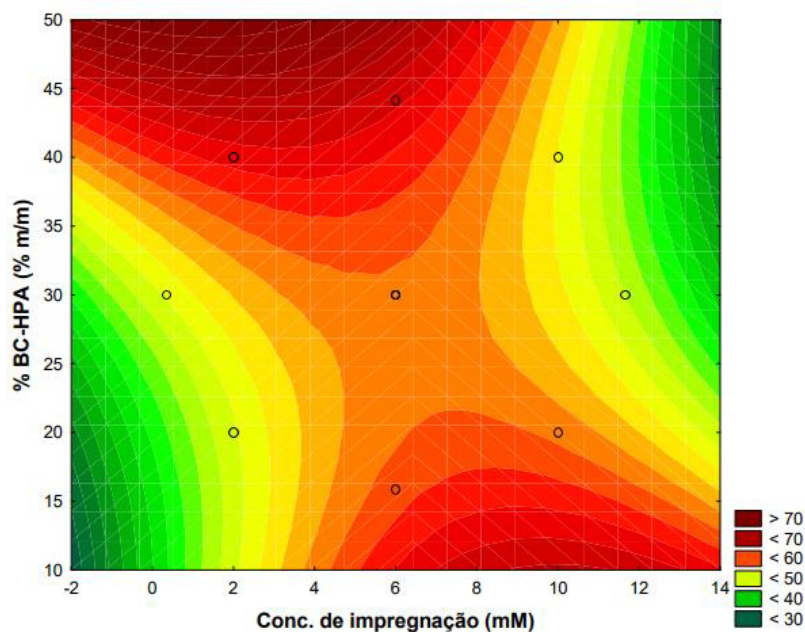
Pela superfície de resposta e curvas de níveis, verifica-se que, a resposta conversão em ésteres aumenta gradualmente com a elevação da concentração de impregnação, porém a elevação do percentual em BC-HPA no meio reacional aumenta rapidamente a conversão dos ésteres quando os percentuais de BC-HPA estão acima de 30%. No entanto, é notado que o aumento gradual de ambos fatores não eleva a resposta em conversão. Novamente, aponta a existência de um efeito sinérgico negativo entre os dois parâmetros.

Figura 35 – Superfície de resposta para a conversão em ésteres etílicos (%EE) para os efeitos das variáveis independentes na TE heterogênea do óleo de macaúba.



Fonte: próprio autor

Figura 36 – Curva de nível para a conversão em ésteres etílicos (%EE) para os efeitos das variáveis resposta na TE heterogênea do óleo de macaúba.



Fonte: próprio autor

Pode-se concluir então que os efeitos dos fatores ocorrem de forma diferente com uma aparente interação negativa para a conversão do óleo. Os melhores ajustes são encontrados em níveis baixos de concentração de impregnação e níveis altos do percentual de BC-HPA. Para atingir uma conversão em ésteres acima de 70%, deve-se combinar a concentração de impregnação na faixa de 2-3,5 mM e o percentual de BC-HPA acima de 40% (m/m). Portanto, para efeito prático, a concentração de impregnação a 2 mM foi fixada para os ensaios exploratórios subsequentes.

5.5 Transesterificação In Situ (TEIS) heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*

Visto que a concentração de impregnação do BC é um fator crítico para a reação de TE no estudo preliminar com óleo de macaúba, para o estudo exploratório da TEIS heterogênea, a concentração de impregnação do BC de *S. maxima* foi fixada em 2 mM. Também, foi fixado a proporção etanol:clorofórmio em 10:1. Neste estudo exploratório buscou-se explorar os níveis do percentual de BC-

HPA-Mo (%BC-HPA-Mo 2mM), da razão álcool/biomassa (mL.g^{-1}) e da temperatura do reator ($^{\circ}\text{C}$) na TEIS da biomassa úmida da microalga *B. braunii*. Para esse propósito, aplicou-se o planejamento experimental de Box-Behnken com três fatores em três níveis, definindo como variáveis independentes o percentual de BC-HPA-Mo, a razão álcool/biomassa e a temperatura. Como variáveis resposta (dependentes) foram considerados o rendimento mássico (mg.g^{-1}), a conversão em ésteres etílicos (%EE) e carboidratos na biomassa residual (% m/m). Os percentuais em ésteres etílicos obtidos na TEIS foram estimados pelas áreas dos picos de interesse nos espectros de RMN¹H. Os espectros de RMN¹H de cada ensaio são apresentados APÊNDICE C.

A Tabela 23 apresenta a matriz experimental juntamente com os resultados das variáveis respostas referentes a cada condição experimental do planejamento Box-Behnken.

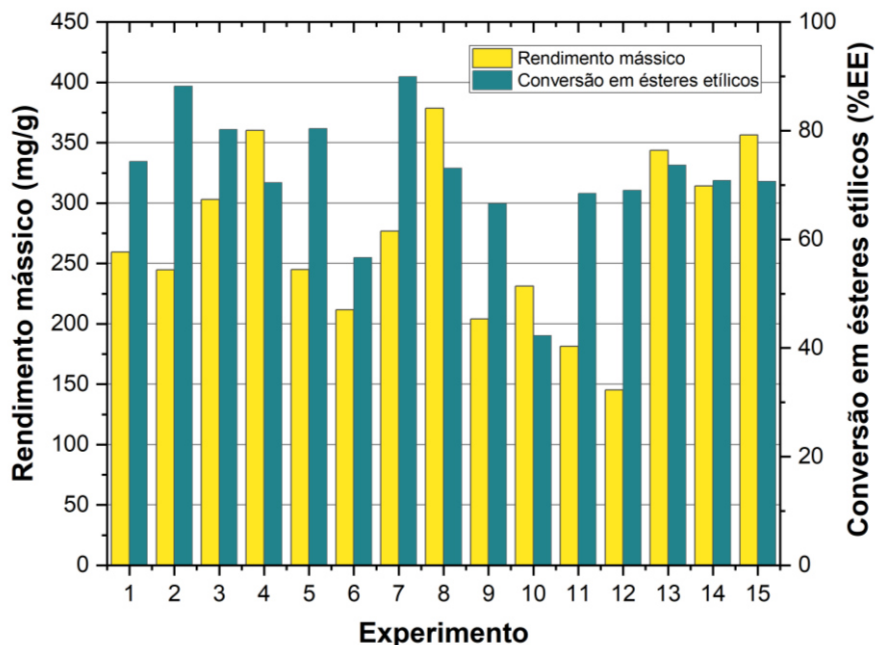
Tabela 23 - Matriz experimental e resultados obtidos na TEIS heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*.

Ensaio	Variáveis independente e níveis			Variáveis resposta		
	Percentual BC-HPA (% m/m)	Razão etanol:BM (mL.g^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento mássico (mg.g^{-1})	Conversão em ésteres etílicos (%EE)	Carboidratos residuais (% m/m)
1	(-1) 10	(-1) 25	(0) 200	259,5	74,32	1,65
2	(1) 20	(-1) 25	(0) 200	244,8	88,22	0,96
3	(-1) 10	(1) 75	(0) 200	303,1	80,22	1,08
4	(1) 20	(1) 75	(0) 200	360,2	70,42	0,95
5	(-1) 10	(0) 50	(-1) 150	244,9	80,42	2,75
6	(1) 20	(0) 50	(-1) 150	211,7	56,64	9,16
7	(-1) 10	(0) 50	(1) 225	276,9	89,95	1,79
8	(1) 20	(0) 50	(1) 225	378,5	73,09	4,41
9	(0) 15	(-1) 25	(-1) 150	204,1	66,58	8,45
10	(0) 15	(1) 75	(-1) 150	231,2	42,26	8,40
11	(0) 15	(-1) 25	(1) 225	181,4	68,46	5,34
12	(0) 15	(1) 75	(1) 225	145,3	69,01	2,15
13	(0) 15	(0) 50	(0) 200	343,7	73,66	2,76
14	(0) 15	(0) 50	(0) 200	314,2	70,86	2,85
15	(0) 15	(0) 50	(0) 200	356,4	70,69	2,24

Fonte: próprio autor

As variáveis resposta rendimento mássico e conversão em ésteres foram plotados em gráfico de barras e apresentado na Figura 37.

Figura 37 – Resultados das variáveis resposta rendimento mássico da TEIS heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*.



Fonte: próprio autor

Para a resposta em rendimento mássico, os ensaios apresentaram uma grande diferenciação entre uma condição experimental e outra, indicando um forte efeito das variáveis sob a extração dos compostos lipídicos durante o processo de TEIS. Sendo o experimento 12 com o menor rendimento em massa, $145,3 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto que o experimento 8 apresentou um rendimento mássico de $378,5 \text{ mg.g}^{-1}$, ou seja, 2,6 vezes maior que o experimento 12. Preliminarmente, a temperatura aparenta ter maior influência sob o rendimento mássico: quanto maior a temperatura, maior foi o processo extrativo.

Enquanto que para a conversão em ésteres etílicos, observa-se que os percentuais não sofreram variação expressivas entre as condições experimentais, apenas nos experimentos 6 e 10 é que ocorre uma queda considerável de conversão (56,64% e 42,26%, respectivamente). De maneira geral, não é possível indicar um parâmetro que tenha maior efeito sobre conversão, mas sim, os efeitos parecem interferir de maneira igual sob a variável resposta conversão em ésteres.

É importante destacar que algumas condições experimentais, em específico os ensaios 2, 7 e 12, o rendimento mássico em material lipídico é baixo apesar da relevante conversão em ésteres. Por essa razão, as duas variáveis

resposta devem ser analisadas afim de aumentar tanto o rendimento mássico quanto a conversão dos lipídios em ésteres.

Dos estudos de TEIS em biomassa de microalgas, Li *et al.* (2011) utilizaram o catalisador Mg-Zr (alcalino) preparado por co-precipitação na TEIS utilizando 45 mL da mistura metanol e o diclorometano como co-solvente (3:1) em 4 h de reação a 65°C, e atingiram 28% de conversão. Ma *et al.* (2015), utilizando alumina (Al₂O₃) impregnada com KOH (17,04 m².g⁻¹ de área de superfície), atingiram uma conversão de 89,53% na TEIS com proporção de 8:1 metanol:biomassa e 10% do catalisador em 5 h de reação a 60°C. A TEIS realizada por Vicente *et al.* (2017) com razão metanol/biomassa de 33:1 e 52% do catalisador de resina de troca iônica (442 m².g⁻¹ de área de superfície) atingiu 76,50% de conversão em 4 h de reação a 95°C. De Luna *et al.* (2017) avaliaram o uso da pedra pomes impregnada com LiOH (2,30 m².g⁻¹ de área de superfície) na TEIS com razão metanol/biomassa de 12:1 e co-solvente hexano (1:1 hexano:metanol) a 80°C por 3 h e alcançou a conversão de 47%.

Kazemifard *et al.* (2019), com o catalisador nano-magnético de Fe₃O₄-Al₂O₃ como suporte para o KOH (18,43 m².g⁻¹ de área de superfície), atingiu 95,60% de conversão utilizando a proporção 12:1 de metanol:biomassa e 4% do catalisador preparado em 6 h de reação a 65°C. Qu *et al.* (2021), por sua vez, em reator de micro-ondas, atingiu 95,8% de conversão na TEIS realizada com 8:1 etanol:biomassa a 70 °C em 50 min de reação com o 2% do catalisador magnético de óxido mediados por polietilenoglicol (PEG/MgO/ZSM-5@Fe₃O₄) de 270 m².g⁻¹ de área de superfície.

Zorn *et al.* (2020, 2022b) apresentam o uso do HPA de Mo suportado em alumina (ZORN *et al.*, 2020) e óxido de nióbio (ZORN *et al.*, 2022b) na TEIS da biomassa de três diferentes microalgas em reator pressurizado. O HPA-Mo/Al₂O₃ (31,7 m².g⁻¹ e 6.8 mmol H⁺.g⁻¹ de acidez de superfície) apresentou uma conversão acima de 96% na TEIS de biomassa úmida (15%) com razão molar etanol/óleo de 120:1 com 20% do catalisador em 6 h de reação a 200°C. Já o HPA-Mo/Nb₂O₅ (30,2 m².g⁻¹ e 5.6 mmol H⁺.g⁻¹ de acidez de superfície) alcançou 92,94% de conversão na TEIS com razão molar etanol:óleo de 180:1, com 40% (v/v) de hexano como co-solvente e 10% do catalisador em 6 h de reação a 250°C.

Pela literatura, percebe-se que as reações realizadas em condições de volume variável e pressão atmosférica, o uso de catalisadores heterogêneos em

reações de TEIS é dificultada, principalmente pela necessidade do acesso dos reagentes na superfície do sólido catalisador dada pela transferência de massa e fenômenos de difusão intra e extra partícula. Como afirma Cordeiro *et al.*, 2011, a catálise pelo sólido dependerá da natureza da acidez de Lewis ou de Brønsted-Lowry presente no sólido. Logo, a reação de TE não ocorre necessariamente no poro, mas os grupos de ácido de Brønsted da superfície do sólido são suficientes para catalisar a reação. Chi *et al.* (2021) descrevem que os mesoporos (dimensão média de 5,8 nm) podem acomodar as moléculas de TG (de 2,5 nm) que serão colididas com o álcool durante a reação. Logo, a porosidade do suporte é importante para melhorar a área de contato dos reagentes, entretanto, o material poroso deve ter tamanho de poro superior a 2,5 nm para acomodar efetivamente o triglicerídeo.

Assim, é possível presumir que as reações TEIS da biomassa de microalgas necessitem de maior temperatura e pressão para os reagentes acessarem as cavidades e colidirem no sítio ativo do catalisador heterogêneo, mesmo em TEIS como catalisadores de baixa área superficial como apresentado neste trabalho e nos trabalhos de Ma *et al.* (2015), De Luna *et al.* (2017), Kazemifard *et al.* (2019) e Zorn *et al.* (2020, 2022). Como visto, principalmente para os HPAs suportados, os sólidos não apresentam grande área superficial, porém possuem força ácida superficial suficiente para catalisar as reações esterificação e TE.

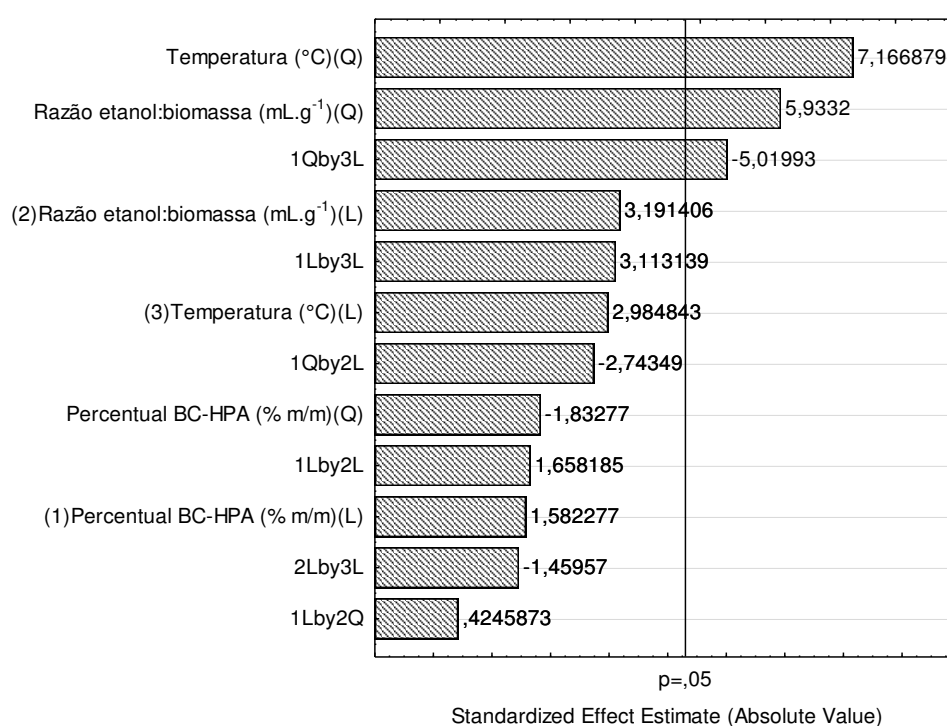
5.5.1 Análise estatística do rendimento mássico

A Figura 38 apresenta o diagrama de Pareto para a variável resposta rendimento mássico (mg.g^{-1}) na TEIS heterogênea.

Dentre os fatores do diagrama de Pareto, os fatores de forma quadrática (Q) temperatura e razão etanol:biomassa tiveram influência estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95% e de forma positiva, onde o aumento no valor destes parâmetros conduziu um aumento no rendimento mássico. O aumento do menor nível para o maior nível aumenta em $7,17 \text{ mg.g}^{-1}$ e $5,93 \text{ mg.g}^{-1}$ para as variáveis independentes temperatura (150-225 °C) e razão etanol:biomassa (25-75 mL.g^{-1}), respectivamente. Enquanto que a interação do percentual de BC-HPA (Q) e temperatura (L), 1Qby3L, também tiveram influência estatisticamente significativa

ao nível de confiança de 95%, no entanto, de forma negativa. O aumento do menor nível para o maior nível no percentual de BC-HPA e na temperatura diminui o rendimento mássico em 5,02 mg.g⁻¹. Como abordado anteriormente, os três parâmetros afetam de maneira similar a variável resposta rendimento mássico, no entanto, a temperatura tem um efeito ligeiramente maior que os demais parâmetros para esta variável resposta.

Figura 38 - Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sob a variável resposta rendimento mássico (mg.g⁻¹) na TEIS heterogênea.



Fonte: próprio autor

A ANOVA ao nível de confiança de 95% nos ensaios da matriz experimental é apresentado na Tabela 24.

O modelo quadrático foi estatisticamente bem ajustado, com coeficiente R² de 0,9866, indicando que 98,66% da variabilidade das respostas foram explicadas pelo modelo quadrático. A análise do teste F e *p*-valor reafirmam que os fatores quadráticos razão etanol:biomassa, temperatura e a interação 1Qby3L são estatisticamente significativos (*p* < 0,05) e possui os maiores efeitos sob o rendimento mássico segundo o teste F. A interação significativa 1Qby3L (percentual BC-HPA e temperatura) não deve ser ignorada e os parâmetros devem ser tratados juntos.

A partir da análise de regressão foi obtido um modelo representativo do comportamento dos resultados dos experimentos para o rendimento mássico. Os dados dos coeficientes de regressão do modelo polinomial são apresentados na Tabela 25

Tabela 24 - ANOVA para o modelo quadrático de superfície de resposta para variável reposta rendimento mássico (mg.g^{-1}) da TEIS heterogênea.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
X₁ (Linear)	1173,51	1	1173,51	2,5036	0,2544
X₁ (Quadrática)	1574,48	1	1574,48	3,3590	0,2083
X₂ (Linear)	4774,05	1	4774,05	10,1851	0,0857
X₂ (Quadrática)	16500,64	1	16500,64	35,2029	0,0273
X₃ (Linear)	4176,05	1	4176,05	8,9093	0,0963
X₃ (Quadrática)	24075,92	1	24075,92	51,3642	0,0189
X₁ (L).X₂ (L)	1288,81	1	1288,81	2,7496	0,2391
X₁ (L).X₂ (Q)	84,50	1	84,50	0,1803	0,7125
X₁ (Q).X₂ (L)	3528,00	1	3528,00	7,5267	0,1111
X₁ (L).X₃ (L)	4542,76	1	4542,76	9,6916	0,0895
X₁ (Q).X₃ (L)	11811,85	1	11811,85	25,1997	0,0375
X₂ (L).X₃ (L)	998,56	1	998,56	2,1304	0,2818
Erro	937,46	2	468,73		
Total SQ	69921,97	14			

X₁ = percentual de BC-HPA, X₂ = razão etanol:biomassa, X₃ = temperatura, GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p
Fonte: próprio autor

Tabela 25 - Coeficientes de regressão para a variável reposta rendimento mássico na TEIS heterogênea.

Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t	p
Média	338,1000	12,4997	27,0486	0,0014
X₁ (Linear)	17,1	10,82509	1,579664	0,254953
X₁ (Quadrática)	20,65	11,26711	1,832769	0,208294
X₂ (Linear)	-2,25	10,82509	-0,20785	0,85459
X₂ (Quadrática)	-66,85	11,26711	-5,9332	0,027251
X₃ (Linear)	-27,15	10,82509	-2,50806	0,128934
X₃ (Quadrática)	-80,75	11,26711	-7,16688	0,018918
X₁ (L).X₂ (L)	17,95	10,8251	1,65819	0,23914
X₁ (L).X₂ (Q)	-6,5	15,309	-0,4246	0,71245
X₁ (Q).X₂ (L)	42	15,309	2,74349	0,11114
X₁ (L).X₃ (L)	33,7	10,8251	3,11314	0,08954
X₁ (Q).X₃ (L)	76,85	15,30898	5,019928	0,037467
X₂ (L).X₃ (L)	-15,8	10,82509	-1,45957	0,281822

X₁ = percentual de BC-HPA, X₂ = razão etanol:biomassa, X₃ = temperatura, GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p
Fonte: próprio autor

O modelo obtido pela análise de regressão é apresentado na Equação (8).

$$\begin{aligned}
 Y = & 338,10 + 17,1X_1 + 20,65X_1^2 - 2,25X_2 - 66,85X_2^2 - 27,15X_3 - 80,75X_3^2 \\
 & + 17,95X_1 \cdot X_2 - 6,5X_1 \cdot X_2^2 + 42X_1^2 \cdot X_2 + 33,7X_1 \cdot X_3 \\
 & + 76,85X_1^2 \cdot X_3 - 15,8X_2 \cdot X_3
 \end{aligned} \quad (8)$$

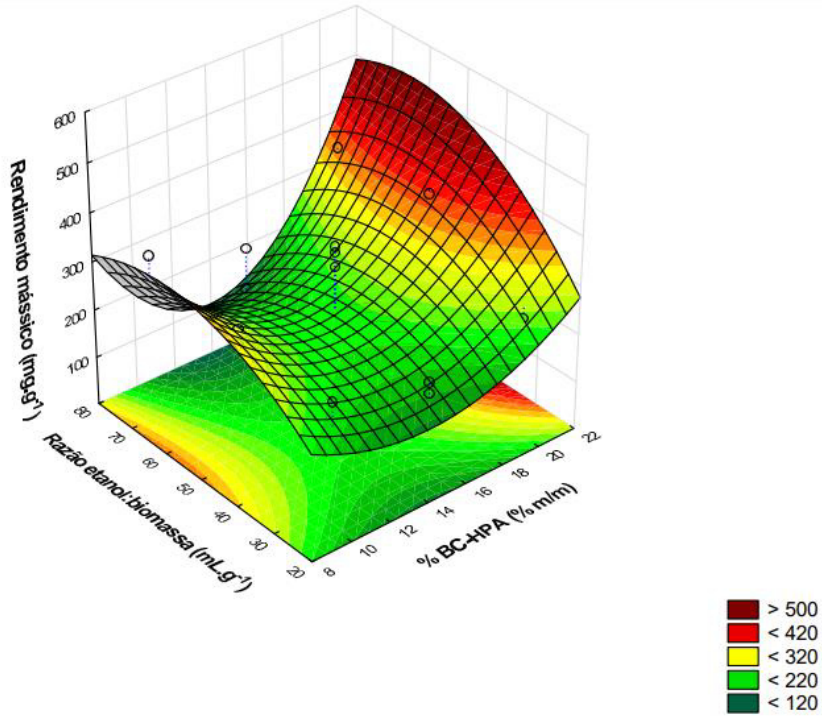
As superfícies de resposta do modelo são apresentadas na Figura 39, Figura 40 e Figura 41.

Pela superfície de resposta para os efeitos do percentual de BC-HPA e razão etanol:biomassa (Figura 39), a interação dos parâmetros demonstra a existência de uma faixa preferível do percentual de BC-HPA acima de 20% e da razão etanol:biomassa na faixa de 40-75 mL.g⁻¹ para o aumento da resposta em rendimento mássico. O efeito foi semelhante para os efeitos do percentual de BC-HPA e temperatura (Figura 40) onde o rendimento aumentou junto ao maior percentual de BC-HPA acima de 20% e uma região preferível de temperatura entre 200-225 °C. Como visto na tabela ANOVA, os efeitos do percentual do catalisador de BC não foram significativos no processo de extração, o mesmo ocorreu no trabalho realizado anterior com catalisador homogêneo (PEDRO *et al.*, 2021), onde a concentração e tipo de catalisador não influenciaram na extração do material lipídico durante a TEIS úmida, no entanto, a concentração em níveis mais alto tendem a melhorar o rendimento mássico.

Por fim, os efeitos da razão etanol:biomassa e a temperatura (Figura 41), parâmetros significativos e de maior efeito, indicam que os níveis centrais destes parâmetros (50 mL.g⁻¹ e 200 °C) são o melhor ajuste para atingir o máximo da extração dos compostos lipídicos. Provavelmente, devido ao fato da temperatura intermediária melhorar a miscibilidade das espécies - solventes, biomassa e lipídios (EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010) - resultando em melhor difusão do material lipídico para o meio. Pode-se supor que a permeabilidade na biomassa seja melhorada pela pressão posto que, como comprova Nguyen *et al.* (2020), o rendimento em material lipídico é devido em grande parte pela difusão entre o óleo e solventes, e não afetado pelo grau de quebra de células.

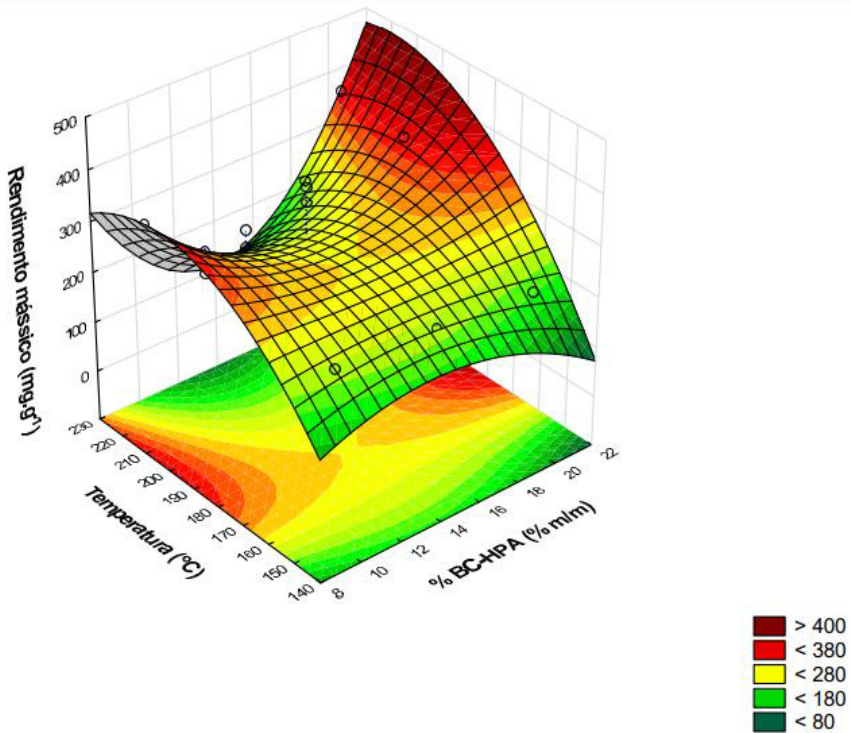
Assim, o melhor ajuste dos parâmetros para o rendimento mássico deve seguir 20% do BC-HPA, razão etanol:biomassa de 50 mL.g⁻¹ e 200 °C de temperatura para obter a maior extração do material lipídico.

Figura 39 - Superfície de resposta para o rendimento mássico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) para os efeitos do percentual de BC-HPA e razão etanol:biomassa na TEIS heterogênea.



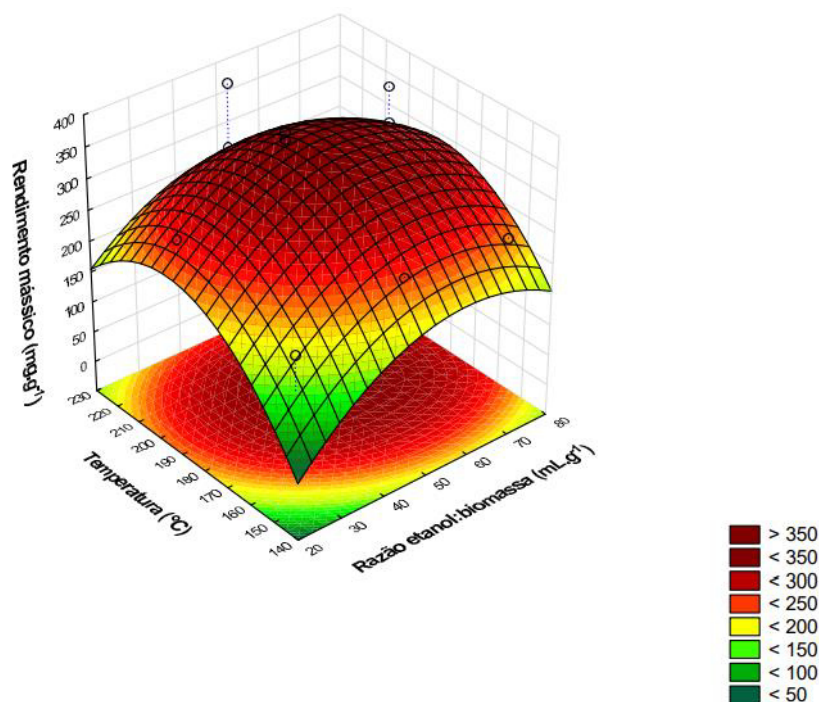
Fonte: Próprio autor

Figura 40 - Superfície de resposta para o rendimento mássico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) para os efeitos do percentual de BC-HPA e temperatura na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Figura 41 - Superfície de resposta para o rendimento mássico (mg.g^{-1}) para os efeitos da razão etanol:biomassa e temperatura na TEIS heterogênea.



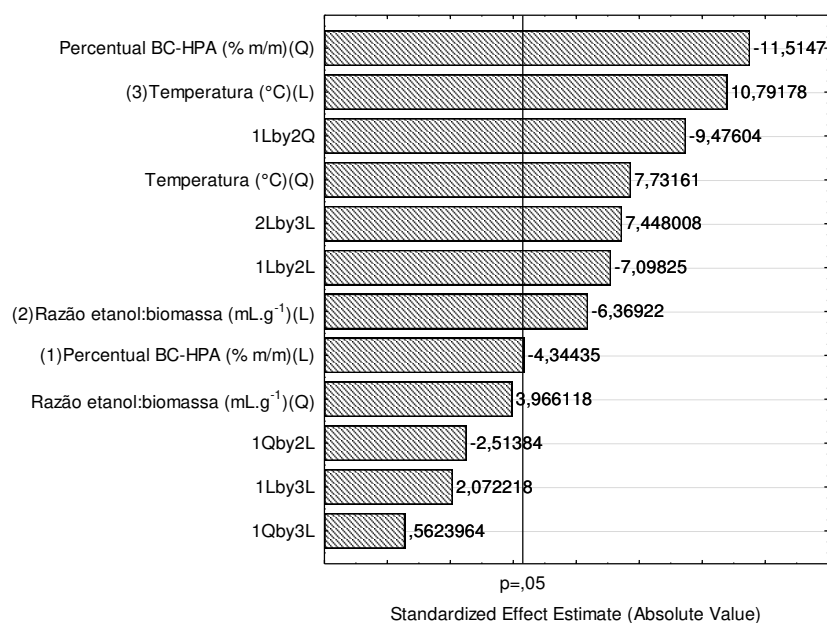
Fonte: Próprio autor

5.5.2 Análise estatística da conversão em ésteres etílicos

A Figura 42 apresenta o diagrama de Pareto para a variável resposta conversão em ésteres etílicos (%EE) na TEIS heterogênea.

Pelo diagrama, é visto que a maioria dos fatores para a conversão foram estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança. Os parâmetros e as interações apresentaram efeitos distintos para a variável resposta. De forma positiva, a temperatura na forma linear foi o parâmetro de maior influência (10,79%) seguido da temperatura na forma quadrática (7,73%) e interação da razão etanol:biomassa e temperatura (2Lby3L), ambos na forma linear (7,45%), aumentam a conversão quando em níveis altos. E de forma negativa, o percentual do BC-HPA na forma quadrática foi o parâmetro de maior influência (-11,52%), seguido das suas interações com a razão na forma quadrática e linear (1Lby2Q e 1Lby2L, -9,48 e -7,01%, respectivamente) e o percentual do catalisador na forma linear (-4,34%). Em geral, todos os parâmetros tiveram efeito sob a conversão, bem como as interações entre os fatores, demonstrando a importância da análise conjunta dos efeitos.

Figura 42 - Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sob a variável resposta conversão em ésteres etílicos (%EE) na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

A ANOVA ao nível de confiança de 95% nos ensaios da matriz experimental é apresentado na Tabela 26.

Tabela 26 - ANOVA para o modelo quadrático de superfície de resposta para variável reposta conversão em ésteres etílicos (%EE) da TEIS heterogênea.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
X₁ (Linear)	52,618	1	52,6177	18,8734	0,0491
X₁ (Quadrática)	369,649	1	369,6493	132,5894	0,0075
X₂ (Linear)	113,098	1	113,0977	40,5670	0,0238
X₂ (Quadrática)	43,854	1	43,8543	15,7301	0,0581
X₃ (Linear)	324,689	1	324,6891	116,4626	0,0085
X₃ (Quadrática)	166,656	1	166,6560	59,7778	0,0163
X₁ (L).X₂ (L)	140,470	1	140,4699	50,3851	0,0193
X₁ (L).X₂ (Q)	250,343	1	250,3427	89,7953	0,0110
X₁ (Q).X₂ (L)	17,618	1	17,6180	6,3194	0,1285
X₁ (L).X₃ (L)	11,972	1	11,9716	4,2941	0,1740
X₁ (Q).X₃ (L)	0,882	1	0,8818	0,3163	0,6305
X₂ (L).X₃ (L)	154,654	1	154,6541	55,4728	0,0176
Erro	5,576	2	2,7879		
Total SQ	1908,691	14			

X₁ = percentual de BC-HPA, X₂ = razão etanol:biomassa, X₃ = temperatura, GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p

Fonte: próprio autor

O modelo quadrático foi estaticamente bem ajustado, com coeficiente R^2 de 0,9971, indicando que 99,71% da variabilidade das respostas foram explicadas pelo modelo quadrático. A análise do teste F e *p*-valor reafirmam que os fatores que a maioria dos parâmetros são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Novamente, as interações dos fatores mostraram-se importantes para a conversão e não devem ser ignoradas e devem ser tratados de forma conjunta.

A partir da análise de regressão foi obtido um modelo representativo do comportamento dos resultados dos experimentos para a conversão em ésteres etílicos. O modelo foi obtido pelo software Statistica 10 e os dados dos coeficientes de regressão e confecção do modelo polinomial são apresentados na Tabela 27

Tabela 27 - Coeficientes de regressão para a variável reposta conversão em ésteres etílicos (%EE) para a TEIS heterogênea.

Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t	p
Média	71,7387	0,964006	74,4172	0,0002
X₁ (Linear)	-10,1620	0,834854	-12,1722	0,0067
X₁ (Quadrática)	10,0057	0,868944	11,5147	0,0075
X₂ (Linear)	-5,9420	0,834854	-7,1174	0,0192
X₂ (Quadrática)	-3,4463	0,868944	-3,9661	0,0581
X₃ (Linear)	7,1580	0,834854	8,5740	0,0133
X₃ (Quadrática)	-6,7183	0,868944	-7,7316	0,0163
X₁ (L).X₂ (L)	-5,9260	0,834854	-7,0982	0,0193
X₁ (L).X₂ (Q)	11,1880	1,180662	9,4760	0,0110
X₁ (Q).X₂ (L)	2,9680	1,180662	2,5138	0,1285
X₁ (L).X₃ (L)	1,7300	0,834854	2,0722	0,1740
X₁ (Q).X₃ (L)	-0,6640	1,180662	-0,5624	0,6305
X₂ (L).X₃ (L)	6,2180	0,834854	7,4480	0,0176

X₁ = percentual de BC-HPA, X₂ = razão etanol:biomassa, X₃ = temperatura, t – Teste t; P – Valor-p

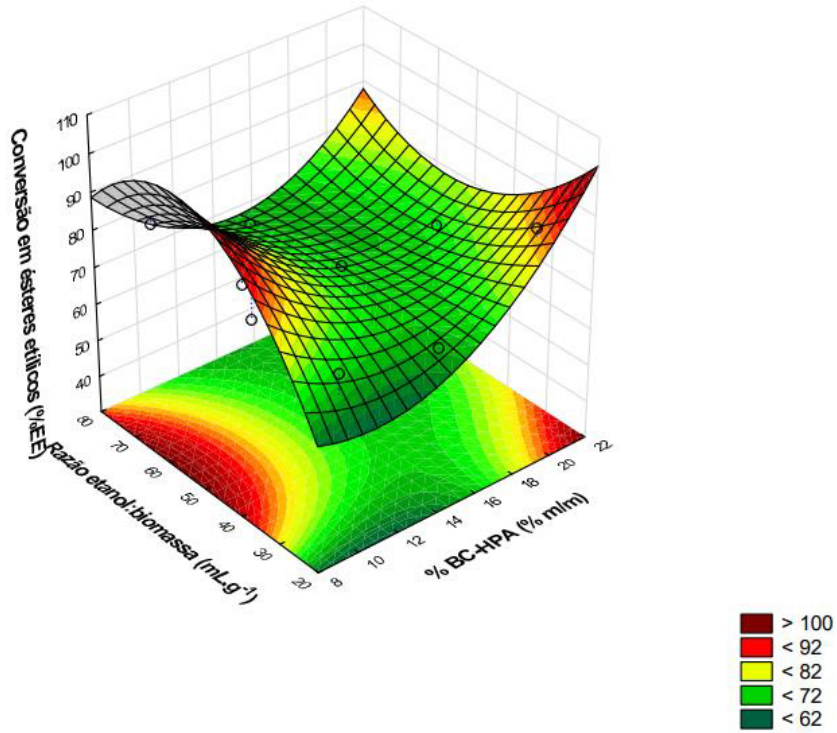
Fonte: próprio autor

O modelo obtido pela análise de regressão é apresentado na Equação (9).

$$\begin{aligned}
 Y = & 71,74 - 10,16X_1 + 10,01X_1^2 - 5,94X_2 - 3,45X_2^2 - 7,16X_3 \\
 & - 6,72X_3^2 - 5,93X_1 \cdot X_2 + 11,19X_1 \cdot X_2^2 + 2,97X_1^2 \cdot X_2 \quad (9) \\
 & + 1,73X_1 \cdot X_3 - 0,66X_1^2 \cdot X_3 + 6,22X_2 \cdot X_3
 \end{aligned}$$

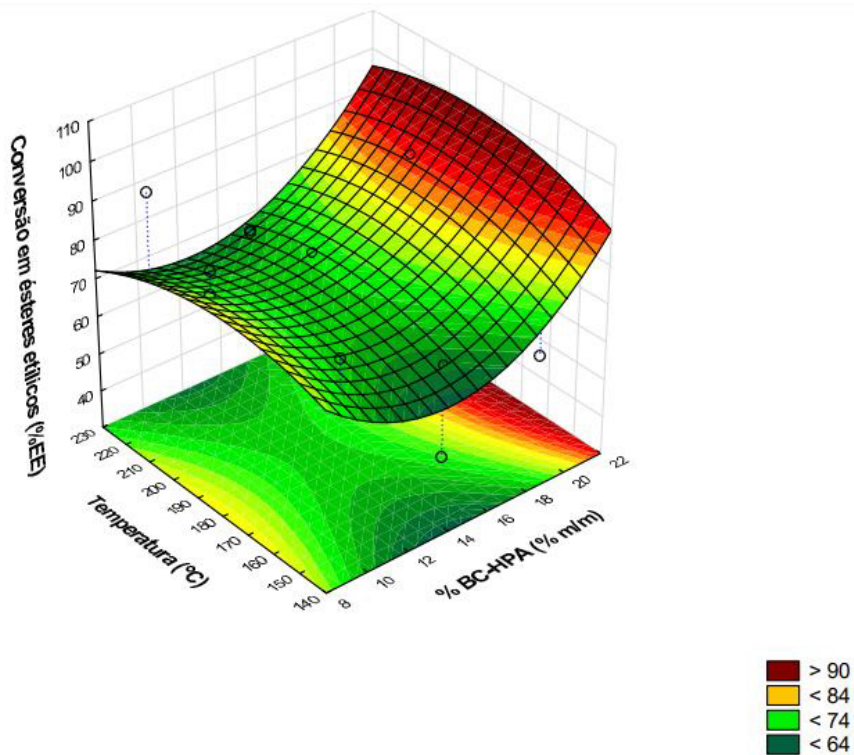
Os gráficos de superfície de resposta para conversão em ésteres etílicos são apresentados na Figura 43, Figura 44 e Figura 45.

Figura 43 - Superfície de resposta para a conversão em ésteres etílicos (%EE) para os efeitos do percentual de BC-HPA e razão etanol:biomassa na TEIS heterogênea.



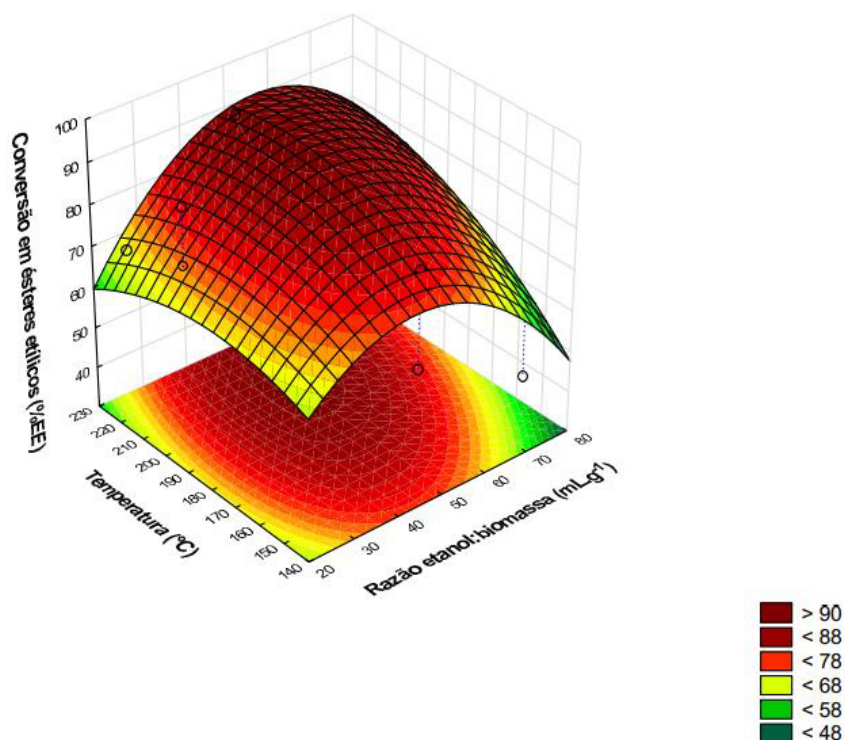
Fonte: Próprio autor

Figura 44 - Superfície de resposta para a conversão em ésteres etílicos (%EE) para os efeitos do percentual de BC-HPA e temperatura na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Figura 45 - Superfície de resposta para a conversão em ésteres etílicos para os efeitos da razão etanol:biomassa e temperatura na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Pela superfície de respostas para os efeitos do percentual de BC-HPA e razão etanol:biomassa (Figura 43), a interação dos parâmetros demonstra a conversão é maior nos menores percentuais do BC-HPA, cerca de 8-10%, porém em razão etanol:biomassa acima de 40 mL.g⁻¹. Para Nguyen *et al.* (2020), o efeito da concentração do álcool também teve maior impacto em comparação a concentração do catalisador (homogêneo H₂SO₄) para alcançar alto rendimento de ésteres de ácido graxo.

O oposto ocorreu na interação do percentual de BC-HPA e temperatura (Figura 44), onde a conversão se apresentar maior a partir de 20% do BC-HPA, sendo melhor para o intervalo de temperatura de 180-215 °C. Aqui, a temperatura aparenta melhorar a permeação dos reagentes no catalisador, assim, a maior quantidade do catalisador aumenta a conversão.

Por fim, para os efeitos da razão etanol:biomassa e temperatura (Figura 45), os níveis centrais de etanol e temperatura são os ajustes que atingem maior conversão, assim como foi para o rendimento mássico. Neste caso, as pressões um pouco mais altas que o nível central (200-220 °C) favoreceram a conversão e o

etanol no intervalo de 50-60 mL.g⁻¹ garantem a conversão acima de 90%. Provavelmente, devido a maior número de colisões dos reagentes em maior temperatura, bem como miscibilidade melhorada, assim como explicado para o rendimento mássico.

5.5.3 Discussões gerais

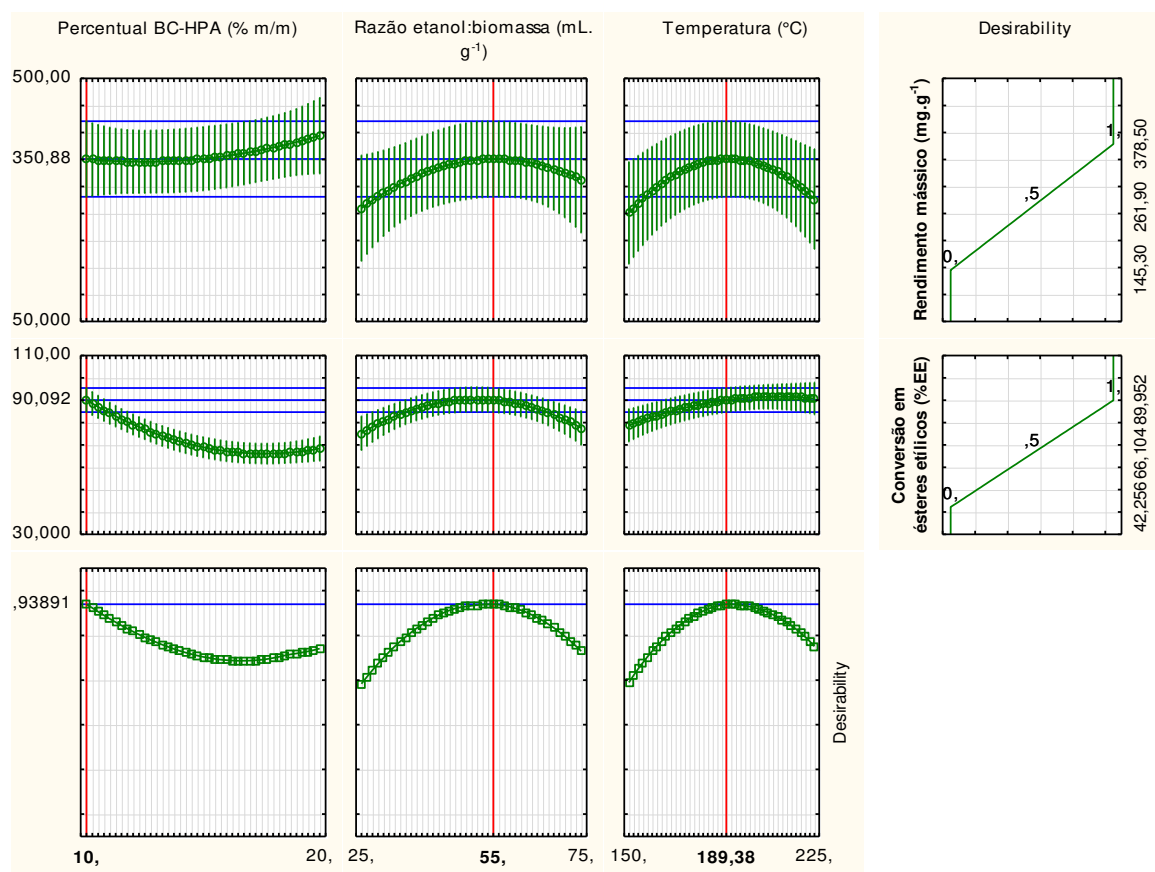
Para estabelecer as condições de ajuste mais favoráveis para maximizar as duas variáveis resposta, rendimento mássico e conversão em ésteres etílicos, foi utilizada o procedimento de otimização gráfica (função Desirability) do software Statistica 10. A Figura 46 mostra o perfil de otimização obtido para o uso de BC-HPA na TEIS heterogênea da biomassa úmida da *B. braunii* para as três variáveis independentes estudadas.

As linhas vermelhas no gráfico indicam os valores ótimos do ajuste dos parâmetros e a pontuação de desabilidade de 0,9239 sugere o percentual de BC-HPA em 10%, razão etanol:biomassa em 55 mL.g⁻¹ e temperatura em 189°C. Esse melhor ajuste prediz um rendimento mássico de 350,88 mg.g⁻¹ em material lipídico com uma conversão de 90,09% em ésteres etílicos.

Ressalta-se que as reações desse estudo foram realizadas com duração de 2 h para investigar a variação dos fatores que melhorasse a cinética de reação nos primeiros momentos da reação, a fim de diminuir o tempo de reação. Pois, como confirma Branco *et al.* (2020), a reação de TEIS ocorre rapidamente nos primeiros 60 min da reação. Logo, o tempo adicional é utilizado para permitir a colisão dos reagentes não reagidos. Assim, para resultados padrão ANP (>95% de conversão), reações com mais tempo de duração (8-20 h) tendem a atingirem a conversão mínima exigida.

O nível baixo do percentual de BC-HPA e níveis médios de etanol e temperatura dados como melhores ajustes afirmam a premissa dada por Kim *et al.* (2019) em que a TEIS úmida em zonas de temperaturas médias (100-200°C) reduz relativamente o consumo de álcool, catalisador e co-solvente para as reações de TEIS.

Figura 46 – Perfis para valores previstos e desejabilidade (Função Desirability) de melhor ajuste das variáveis resposta na TEIS heterogênea.



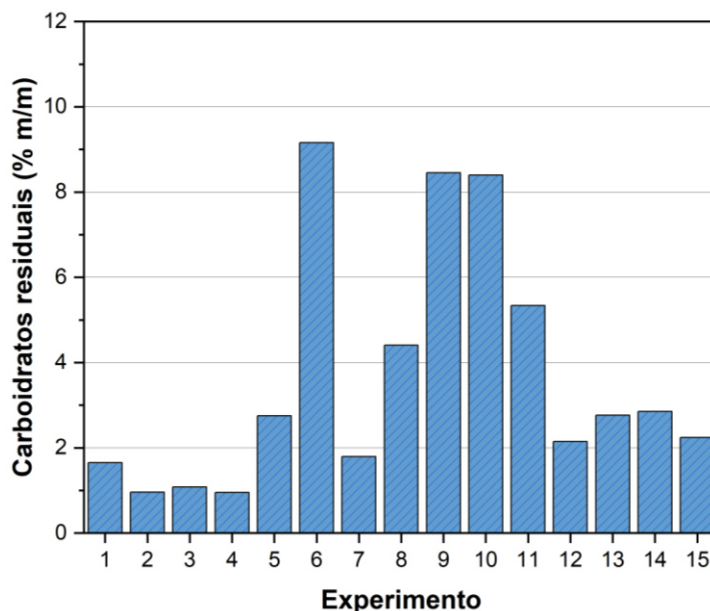
Fonte: Próprio autor

5.6 Carboidratos biomassa residual da TEIS

A análise do percentual de carboidratos (açúcares redutores) foi realizada como maneira de investigar o potencial da biomassa residual do processo de TEIS como matéria-prima para a produção de bioetanol delineando a produção em cascata em biorefinaria de microalgas. Foi possível determinar os efeitos dos mesmos parâmetros operacionais estudados anteriormente para determinar a influência no teor de carboidratos no resíduo da biomassa. A biomassa residual, baixo teor de lipídios, é descrita como sendo rica em polissacarídeos, celulose e hemicelulose (ISAZA-PÉREZ *et al.*, 2020), enquanto que os carboidratos mais abundantes no hidrolisado de microalgas são glicose, ramnose, xilose e manose (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012).

A Figura 47 apresenta a porcentagem dos açúcares redutores na biomassa residual obtida em cada condição experimental.

Figura 47 - Resultados do percentual de carboidratos da biomassa residual de TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Como percebido, nas condições de operação impostas para as reações de TEIS, as reações diminuíram consideravelmente a quantidade de carboidratos na biomassa residual. O percentual de carboidratos da biomassa *in natura* de *B. braunii* apresentou cerca de 12,9% de açúcares redutores, enquanto que a maioria dos experimentos hidrolisaram grande parte dos carboidratos disponíveis e resultaram em média 2% de carboidratos na biomassa residual. Presumivelmente, a queda no percentual é devido a desidratação dos carboidratos e formação de compostos como hidroximetilfurfural e furfural a partir de açúcares C6 e C5, respectivamente (ISAZA-PÉREZ *et al.*, 2020; REIS; ZHANG; HU, 2014). Apenas os experimentos 6, 9 e 10 preservaram maior quantidade dos açúcares redutores da biomassa, 8,5% em média, demonstrando que as condições aplicadas na reação de TEIS hidrolisa grande parte dos açúcares.

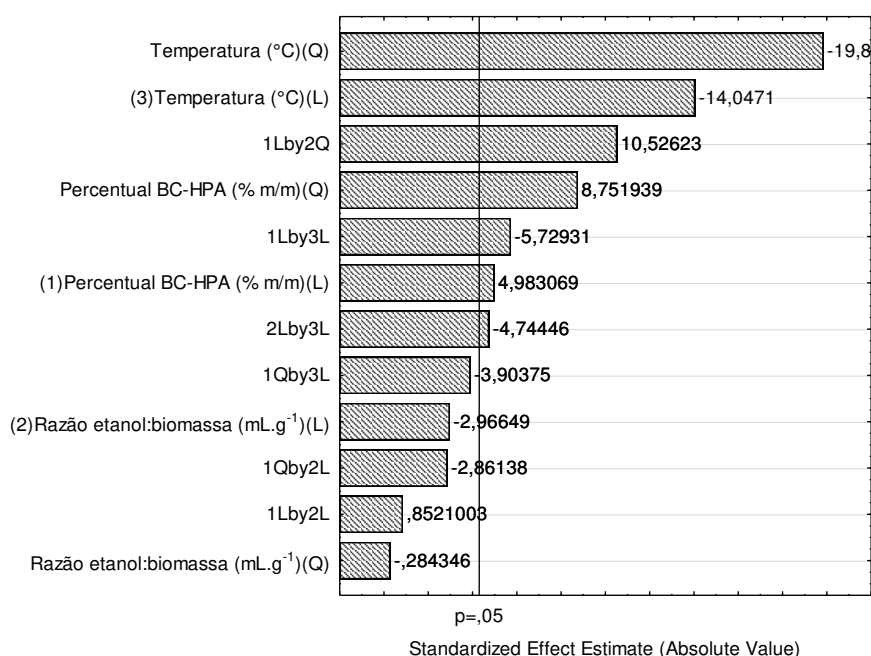
Ma *et al.* (2020) por meio de hidrólise enzimática, obtiveram rendimentos de açúcares redutores do resíduo da microalga *Chlorella vulgaris* (após processo de TEIS) de 54,52%, que foi muito mais próximo da biomassa *in natura* da microalga (59,66%), representando uma perda mínima de açúcar em condições

brandas de reação (55°C e 20 min) catalisado com HCl. Em estudo anterior (PEDRO *et al.*, 2021), a TEIS de catálise homogênea (H₂SO₄ e HCl), a biomassa residual das reações conduzidas com HCl apresentaram maiores percentuais em carboidratos na biomassa residual, variando de 30-32% (m/m), sendo considerado melhor para obtenção de bioetanol em biorefinarias com produção em cascata.

5.6.1 Análise estatística do percentual de carboidratos da biomassa residual

A Figura 48 apresenta o diagrama de Pareto para a variável resposta carboidratos residuais (%m/m) na TEIS heterogênea.

Figura 48 - Diagrama de Pareto para os efeitos sob a variável resposta carboidratos residuais (%m/m) na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Dentre os fatores do diagrama de Pareto, a variável temperatura na forma linear (L) e quadrática (Q) foi o parâmetro de maior influência no percentual de carboidratos residuais. A temperatura (L e Q) foram estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95% e de forma negativa, onde o aumento do nível baixo (150 °C) para o maior nível (225 °C) conduziu para a redução do percentual de carboidratos na biomassa residual. Os parâmetros, também significativos no nível de confiança, percentual de BC-HPA (L e Q) e interação percentual de BC-HPA (L)

e razão etanol:biomassa (Q) – 1Lby2Q - tiveram influência de forma positiva sob a variável resposta. Enquanto que as interações envolvendo a temperatura (1Lby3L e 2Lby3L) tiveram influência significativa de forma negativa.

A ANOVA ao nível de confiança de 95% nos ensaios da matriz experimental é apresentado na Tabela 28.

Tabela 28 - ANOVA para o modelo quadrático de superfície de resposta para variável repostada carboidratos residuais (%m/m) da TEIS heterogênea.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
X₁ (Linear)	2,7175	1	2,71747	24,8310	0,0379
X₁ (Quadrática)	8,3826	1	8,38260	76,5964	0,0128
X₂ (Linear)	0,9631	1	0,96307	8,8001	0,0973
X₂ (Quadrática)	0,0088	1	0,00885	0,0809	0,8028
X₃ (Linear)	21,5945	1	21,59452	197,3210	0,0050
X₃ (Quadrática)	43,0897	1	43,08973	393,7345	0,0025
X₁ (L).X₂ (L)	0,0795	1	0,07946	0,7261	0,4839
X₁ (L).X₂ (Q)	12,1260	1	12,12596	110,8015	0,0089
X₁ (Q).X₂ (L)	0,8960	1	0,89602	8,1875	0,1035
X₁ (L).X₃ (L)	3,5923	1	3,59232	32,8250	0,0291
X₁ (Q).X₃ (L)	1,6678	1	1,66776	15,2393	0,0597
X₂ (L).X₃ (L)	2,4635	1	2,46345	22,5099	0,0416
Erro	0,2189	2	0,10944		
Total SQ	114,4120	14			

X₁ = percentual de BC-HPA, X₂ = razão etanol:biomassa, X₃ = temperatura, GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p
Fonte: próprio autor

O diagrama de Pareto e a tabela ANOVA, demonstram uma grande diferença entre o parâmetro temperatura e os demais, indicando que a temperatura foi o principal fator que influenciou as mudanças no nível de hidrólise dos açúcares durante a TEIS da biomassa úmida. Isso sugere que baixas pressões são cruciais para preservar os açúcares na biomassa residual.

O modelo quadrático foi estatisticamente bem ajustado, com coeficiente R² de 0,9981, indicando que 99,81% da variabilidade das respostas foram explicadas pelo modelo quadrático.

A partir da análise de regressão foi obtido um modelo representativo do comportamento dos resultados dos experimentos para o percentual de carboidratos residuais. O modelo foi obtido pelo software Statistica 10 e os dados dos coeficientes de regressão e confecção do modelo polinomial são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Coeficientes de regressão para a variável repostada carboidratos residuais (%m/m) para a TEIS heterogênea.

Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t	p
Média	2,61853	0,190996	13,7098	0,0052
X₁ (Linear)	2,25589	0,165407	13,6384	0,0053
X₁ (Quadrática)	-1,50675	0,172162	-8,7519	0,0128
X₂ (Linear)	-0,81196	0,165407	-4,9088	0,0390
X₂ (Quadrática)	0,04895	0,172162	0,2843	0,8028
X₃ (Linear)	-2,34061	0,165407	-14,1506	0,0049
X₃ (Quadrática)	3,41616	0,172162	19,8427	0,0025
X₁ (L).X₂ (L)	0,14094	0,165407	0,8521	0,4839
X₁ (L).X₂ (Q)	-2,46231	0,233922	-10,5262	0,0089
X₁ (Q).X₂ (L)	0,66934	0,233922	2,8614	0,1035
X₁ (L).X₃ (L)	-0,94767	0,165407	-5,7293	0,0291
X₁ (Q).X₃ (L)	0,91317	0,233922	3,9038	0,0597
X₂ (L).X₃ (L)	-0,78477	0,165407	-4,7445	0,0416

X₁ = percentual de BC-HPA, X₂ = razão etanol:biomassa, X₃ = temperatura; t – Teste t; p – Valor-p

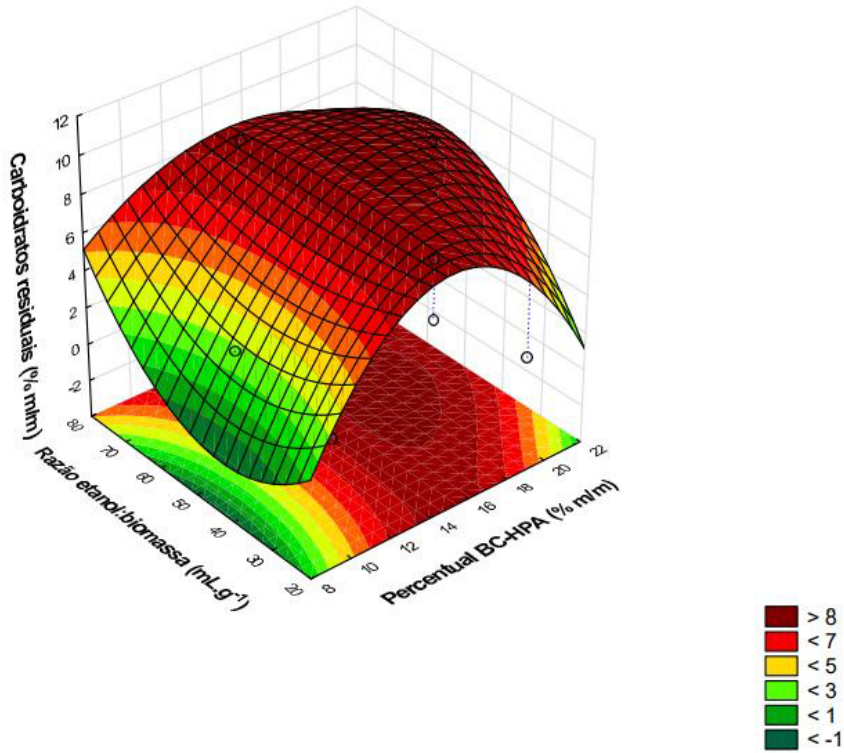
Fonte: próprio autor

O modelo obtido pela análise de regressão é apresentado na Equação (10).

$$\begin{aligned}
 Y = & 2,62 + 2,56X_1 - 1,51X_1^2 - 0,825X_2 \mp 0,05X_2^2 - 2,34X_3 \\
 & \mp 3,42X_3^2 + 0,14X_1 \cdot X_2 - 2,46X_1 \cdot X_2^2 + 0,67X_1^2 \cdot X_2 \quad (10) \\
 & - 0,95X_1 \cdot X_3 + 0,91X_1^2 \cdot X_3 - 0,79X_2 \cdot X_3
 \end{aligned}$$

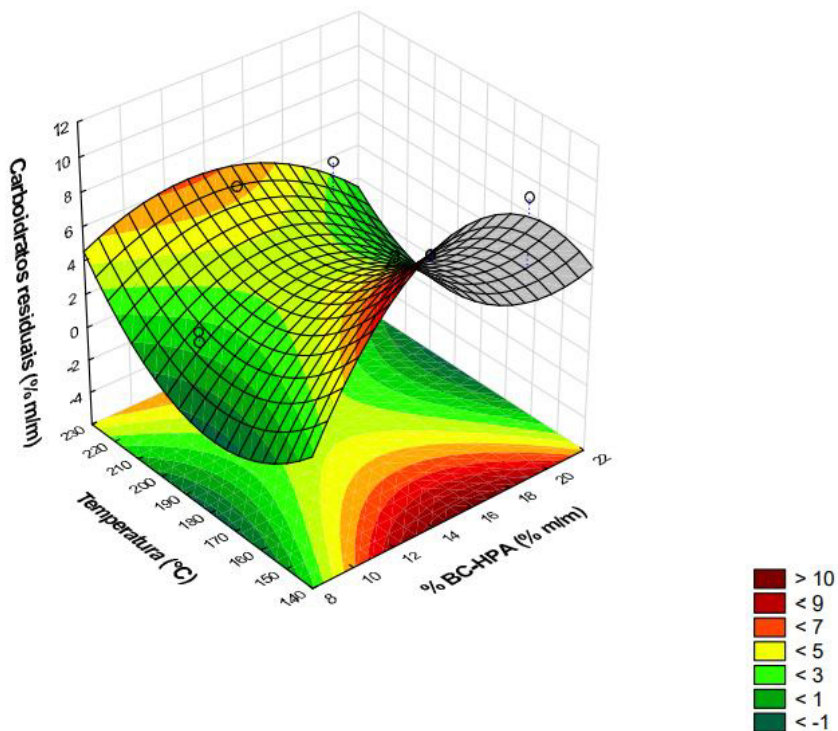
Os gráficos de superfície de resposta são apresentados na Figura 49, Figura 50 e Figura 51.

Figura 49 - Superfície de resposta para carboidratos residuais (%m/m) para os efeitos do percentual de BC-HPA e razão etanol:biomassa na TEIS heterogênea.



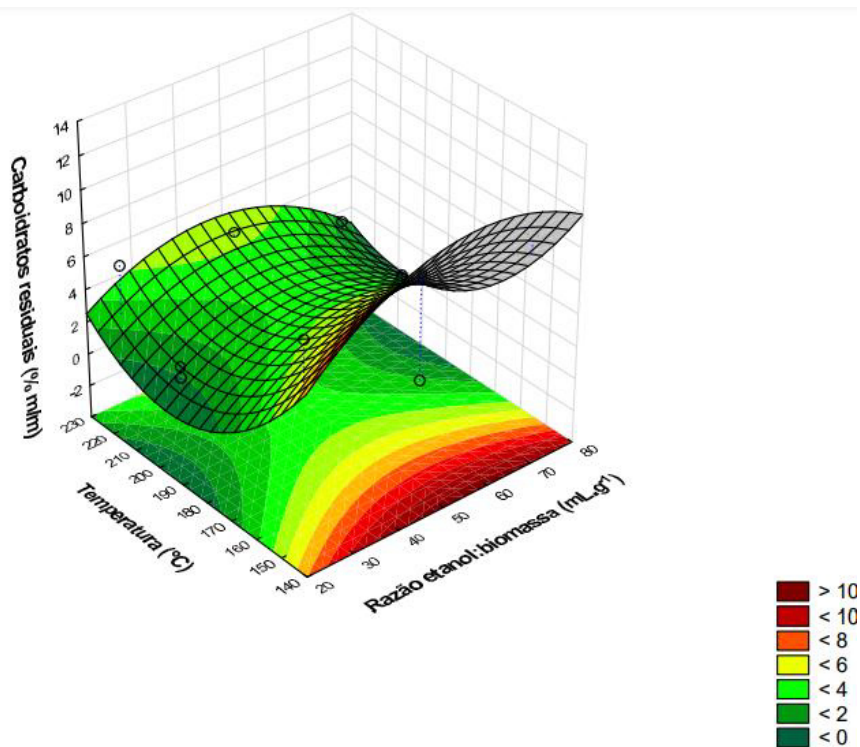
Fonte: Próprio autor

Figura 50 - Superfície de resposta para carboidratos residuais (%m/m) para os efeitos do percentual de BC-HPA e temperatura na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Figura 51 - Superfície de resposta para carboidratos residuais (%m/m) para os efeitos da razão etanol:biomassa e temperatura na TEIS heterogênea.



Fonte: Próprio autor

Pela superfície de resposta para os efeitos do percentual de BC-HPA e razão etanol:biomassa (Figura 49), a interação dos parâmetros demonstra a existência de uma faixa preferível do percentual de BC-HPA próximo de 18% e da razão etanol:biomassa de aproximadamente 50 mL.g⁻¹ para preservar os carboidratos residuais. Enquanto que, para o efeito do percentual de BC-HPA e temperatura (Figura 50) o percentual em carboidratos ficam abaixo de 7% em pressões acima de 165 °C, reafirmando que a alta temperatura hidrolisa a maior parte dos açúcares durante a TEIS. Por fim, os efeitos da razão etanol:biomassa e a temperatura (Figura 51), bastante semelhante ao anterior, indicam que a temperatura acima de 165 °C converge para a maior hidrólise dos carboidratos, enquanto que a razão etanol:biomassa em 50 mL.g⁻¹ garante que os açúcares serão preservados.

Portanto, a menor temperatura (150°C) e razão etanol:biomassa de 50 mL.g⁻¹ são sugeridas para permitir a aplicação da biomassa residual na produção de bioetanol em cascata em biorefinarias de microalgas. Logo, como visto para as outras variáveis resposta, a TEIS em uma zona de temperatura média (100-200°C)

aumenta a viabilidade econômica por reduzir insumos químicos, e também, melhorar produção de coprodutos da hidrólise de carboidratos (KIM *et al.*, 2019).

5.7 Considerações Finais

O desenvolvimento do catalisador heterogêneo baseado em BC de microalgas para aplicação em reações de TEIS abre caminho para a exploração da biomassa residual (baixa em lipídios) e cianobactérias (cultivadas em meios de cultivos de baixo custo) convertidas em BCs e seu potencial uso como suporte catalítico.

O cultivo da cianobactéria *S. maxima* em fontes de nutrientes alternativos (APENDICE A) permitiu a produção da biomassa, bem como bioprodutos de valor agregado (ficocianina), como alternativa de matéria-prima para BC aliada a extração do pigmento. Devido à baixa quantidade de lipídios desta espécie (2,4% em média), a biomassa pode ser utilizada para a produção da ficocianina e dos produtos pirolíticos (BC, bio-óleo e biogás) na biorefinaria de microalgas. Os cultivos demonstraram o uso de acetato de sódio e ureia como alternativa viável para a produção dos biocompostos de interesse evitando o consumo excessivo de nutrientes (fonte de C e N) do meio ZARROUK. E uma segunda alternativa, o chorume também se mostrou viável como macronutrientes do meio de cultivo, diminuindo ainda mais os custos de produção da biomassa, além de mitigar o efeito desse lixiviado que representa ameaça para a natureza.

Segundo Anto *et al.* (2019), a produção de biomassa deve ser aprimorada usando recursos de nutrientes acessíveis, portanto, deve-se basear no fato de que os nutrientes administrados confirmam valorização adequada de biomassa e também seja de fácil aquisição. E que, se esses nutrientes forem disponíveis através de resíduos, não só ajudariam na gestão ambiental, mas também se tornariam um fator de custo-benefício. O bom rendimento em BC a partir das biomassas com fontes alternativas de nutrientes asseguram a matéria-prima para a produção do catalisador baseado em BC.

Com os ensaios de pré-tratamento da biomassa para produção do BC de *S. maxima*, foi observado que não há melhora significativa da área de superfície do BC ($15,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, em média). Possivelmente, a ativação química é agressiva ao

ponto de desintegrar os poros do BC devido a estrutura mais frágil do BC de microalgas dada a ausência de lignina (presente em vegetais) que tornaria o BC mais rígido. Porém, biomassa lignocelulósica necessita de pirólise em temperatura mais altas (cerca de 800°C) para volatilização dos compostos. No entanto, os BCs com pré-tratamento foram eficientes na adsorção do corante têxtil Azul de Metileno em meio aquoso, em média 71,8 mg do corante por grama de BC. A adsorção do corante pelo BC indica a sua aplicabilidade na mitigação deste efluente têxtil, bem como a possível adsorção e fixação dos catalisadores na superfície do BC.

Na seleção do suporte de BC, o método de impregnação do BC por excesso de solvente mostrou ser o mais adequado por conta da característica adsortiva dos BCs, enquanto que por umidade incipiente, que força a deposição do catalisador sob o BC, o catalisador é facilmente desprendido durante a reação. O poder catalítico, testado pela catálise da esterificação do ácido palmítico, demonstram que independentemente do tipo da biomassa, tratamento ou ativação, os BCs tiveram um patamar baixo de conversões. Pela literatura, há indícios de que a força de acidez do HPA seja reduzida ao aderir no BC, explicando a baixa conversão atingida. No entanto, as reações foram conduzidas a 100°C (baixa temperatura) e pressão atmosférica (utilizando condensador de refluxo). Além disso, a atividade do catalisador heterogêneo pode ser afetada por quantidades de clorofilas e fosfolipídios presentes na biomassa de microalgas (CHI *et al.*, 2021). E apesar do catalisador heterogêneo ter maior limitação de transferência de massa entre os reagentes e catalisador, a limitação pode ser superada com a elevação da temperatura de reação que, por consequência, aumenta a miscibilidade e permeabilidade dos reagentes (LEE *et al.*, 2022).

Com as evidências de melhor catálise em condições de temperatura e pressão mais altas, as reações de TE do óleo de macaúba realizadas em reator pressurizado de inox utilizando planejamento fatorial 2² central rotacional, explorou a concentração de HPA na solução de impregnação de HPA-Mo e o percentual mássico do catalisador de BC no meio reacional. Essa análise preliminar indicou que o BC de *S. maxima* deve ser impregnado em soluções de menor concentração, próximas a 2-3,5 mM de HPA-Mo, enquanto que o percentual do catalisador de BC deve ser empregado em níveis mais altos, próximo a 40% (% m/m óleo). Por efeito prático, os estudos subsequentes fixaram a concentração de impregnação em 2 mM (BC-HPA-Mo 2mM).

A exploração do BC-HPA-Mo (2 mM) na reação de TEIS da biomassa úmida de *B. braunii* resultou em síntese eficiente de ésteres. Pelo planejamento experimental de Box-Behnken foi possível investigar as condições que maximizassem tanto o rendimento mássico quanto a conversão da reação. Em 2 h de reação, foi possível atingir conversões próximas a 90% indicando um bom ajuste do uso do BC impregnado como catalisador. Para o rendimento mássico, a temperatura foi o principal responsável por aumentar o rendimento lipídico, preferível entre 200-225°C, seguido pelo percentual de 20% do catalisador. Para a conversão, todos afetaram diretamente a conversão, no entanto, o percentual do catalisador impactou a conversão de maneiras diferentes. Na interação com o etanol, foi preferível que se trabalhasse entre 8-10% de catalisador, enquanto que na interação com a temperatura o percentual preferível fosse acima dos 20% do catalisador. Pela otimização gráfica estatística, foi sugerido que o melhor ajuste que maximiza o rendimento e a conversão é o percentual de BC-HPA em 10% (% m/m biomassa), razão etanol:biomassa 55 mL.g⁻¹ e temperatura em 189°C.

O percentual de carboidratos na biomassa residual da TEIS foi reduzido pela alta temperatura de reação (200°C), logo, foi indicado temperatura a 150°C e etanol a 50 mL.g⁻¹ para preservar os açúcares na biomassa residual utilizada para a produção de bioetanol no processo cascata em biorefinaria de microalgas.

Apesar da extração de óleo da biomassa seca ser preferível em indústrias de óleo comestível, farmacêutico e nutracêuticas (LOH *et al.*, 2021), a TEIS úmida garantiu o menor consumo de energia e tempo, imprescindíveis para a aplicação em biorefinaria de biocombustíveis.

O ciclo de reuso do catalisador de BC não foi realizado devido à falta de tempo hábil para o estudo e à difícil separação do catalisador sólido da biomassa residual. No entanto, geralmente o ciclo de reuso do catalisador tem sua atividade catalítica reduzida devido ao depósito dos TG e glicerol, perda do fósforo e molibdênio (em HPA), bem como a solubilidade dos componentes ativos em álcool (OREGE *et al.*, 2022). Segundo Alcañiz-Monge *et al.* (2013), o HPA-Mo suportado em BC de bambu, sem etapa de regeneração, apresentou queda na conversão a partir do terceiro ciclo de reuso. A diminuição depende da temperatura de reação e da natureza do HPA. Segundo o autor, o ciclo sucessivo do HPA-W apresentou maior perda da atividade catalítica em comparação ao HPA-Mo. E para ambos HPAs, as temperaturas mais altas de reação preservaram o HPA retido no BC.

Logo, se o catalisador a base de BC passar por regeneração (remoção dos compostos depositados), isso aumentaria o ciclo de uso. A separação do catalisador ao término da reação seria facilitada caso o BC passasse por magnetização (adição de Fe_3O_4 na matriz de carbono).

Como visto, o bom rendimento na síntese em ésteres dos estudos deste trabalho abre caminho para exploração e aplicação do BC de microalgas (resíduo ou cultivo específico) como suporte catalítico, aqui, aplicado com eficácia na TEIS da biomassa úmida de microalga.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho autenticam a aplicabilidade do BC de microalgas como suporte catalítico para a síntese de ésteres etílicos de ácido graxo (biodiesel) na TEIS heterogênea da biomassa úmida de microalgas. Sendo uma opção viável para promover a economia circular em biorefinarias.

O catalisador heterogêneo a base de BC final (BC-HPA-Mo 2mM) apresentou acidez superficial média de 3,48 mmol H⁺.g⁻¹ e área superficial de 10,95 m².g⁻¹ e demonstrou, em reator pressurizado, um poder de conversão de 89,95% em ésteres. Ainda que a força de acidez do HPA seja reduzida ao aderir no BC, o BC de microalgas impregnado com o HPA foi capaz de catalisar a TEIS em condições de média-alta temperatura (150-200°C) e com a redução no consumo dos solventes e co-solventes utilizados.

As análises de características físico-químicas mostraram que o BC de biomassa residual de extração de lipídios (baixo teor de óleo) são bastante semelhantes ao BC de *S. maxima* (com e sem o pigmento ficocianina) e conduziram a resultados similares de catálise quando impregnados com o HPA-Mo. À vista disto, a biomassa residual dos processos extrativos de uma biorefinaria é mais opção para a produção do catalisador baseado em BC. Este aproveitamento total da biomassa para produção de catalisador a base de carvão, junto ao ganho com a biorremediação e tratamento de poluentes, projeta a biorefinaria de microalgas cada vez mais próximo a economia circular.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto os resultados promissores, como sugestão para trabalhos futuros recomenda-se:

- Avaliar metodologias de ativação que melhorem a área superficial do BC de microalgas a fim de garantir melhor área de contato possível.
- Sintetizar BC magnético pela inserção de Fe_3O_4 na estrutura para facilitar a recuperação do catalisador de BC.
- Avaliar o ciclo de reuso do catalisador de BC-HPA-Mo.
- Avaliar taxa de lixiviação do Mo no BC impregnado.
- Avaliar a cinética da reação catalisada pelo BC-HPA-Mo.
- Analisar a adsorção de outros corantes têxteis ou efluentes pelo BC.
- Reaplicar o catalisador em outras sínteses orgânicas que utilizem o um catalisador ácido.
- Avaliar a impregnação de outros catalisadores ácido ou enzimas da família das hidrolases.
- Fazer o balanço de massa e energia dentro do conceito de biorefinaria.

REFERÊNCIAS

ADENIYI, O. M.; AZIMOV, U.; BURLUKA, A. Algae biofuel: Current status and future applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 316–335, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás e Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis, 2022. .

AGHILINATEGH, M.; BARATI, M.; HAMADANIAN, M. The modified supercritical media for one-pot biodiesel production from *Chlorella vulgaris* using photochemically-synthesized SrTiO₃ nanocatalyst. **Renewable Energy**, v. 160, p. 176–184, 2020.

ALCAÑIZ-MONGE, J.; EL, B.; TRAUTWEIN, G.; REINOSO, S. Zirconia-supported tungstophosphoric heteropolyacid as heterogeneous acid catalyst for biodiesel production. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 224, p. 194–203, 2018.

ALCAÑIZ-MONGE, J.; TRAUTWEIN, G.; MARCO-LOZAR, J. P. Biodiesel production by acid catalysis with heteropolyacids supported on activated carbon fibers. **Applied Catalysis A: General**, v. 468, p. 432–441, 2013.

ALCAÑIZ-MONGE, J.; TRAUTWEIN, G.; PARRÉS-ESCLAPEZ, S.; MACÍÁ-AGULLÓ, J. A. Influence of microporosity of activated carbons as a support of polyoxometalates. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 115, n. 3, p. 440–446, 2008.

ALMEIDA, L. C.; BARBOSA, A. S.; FRICKS, A. T.; FREITAS, L. S.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 124–129, 2017.

AMARAL, M. D. S.; LOURES, C. C. A.; SILVA, M. B.; PRATA, A. M. R. Adjustment of the operational parameters of an unconventional integrated and illuminated internally photobioreactor (ILI-PBR) for the batch autotrophic cultivation of the *Chlorella minutissima*, using the Taguchi method. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, p. 245–257, 2020a.

AMARAL, M. S.; LOURES, C. C. A.; PEDRO, G. A.; REIS, C. E. R.; CASTRO, F. De; NAVES, F. L.; SILVA, M. B.; PRATA, A. M. R. An unconventional two-stage cultivation strategy to increase the lipid content and fatty acid profile on *Chlorella minutissima* biomass cultivated in a novel internal light integrated photobioreactor aiming at biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 156, p. 591–601, 2020b.

AMARAL, M. S.; ZORN, S. M. F. E.; PEDRO, G. A.; BREDDA, E. H.; PRATA, A. M. R.; SILVA, M. B. Kinetics of photoautotrophic cell growth of the marine microalgae *Chlorella minutissima*. Influence of white, blue and red LEDs in cultivation. **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 11, p. 6084–

6087, 2016.

AMIN, M.; CHETPATTANANONNDH, P. Biochar from extracted marine *Chlorella* sp. residue for high efficiency adsorption with ultrasonication to remove Cr(VI), Zn(II) and Ni(II). **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121578, 2019.

AMIN, M.; CHETPATTANANONNDH, P.; KHAN, M. N. Ultrasound assisted adsorption of reactive dye-145 by biochars from marine *Chlorella* sp. extracted solid waste pyrolyzed at various temperatures. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, p. 104403, 2020.

ANTO, S.; KARPAGAM, R.; RENUKADEVI, P.; JAWAHARRAJ, K.; VARALAKSHMI, P. Biomass enhancement and bioconversion of brown marine microalgal lipid using heterogeneous catalysts mediated transesterification from biowaste derived biochar and bionanoparticle. **Fuel**, v. 255, p. 115789, 2019.

ANTO, S.; SUDHAKAR, M. P.; SHAN AHAMED, T.; SAMUEL, M. S.; MATHIMANI, T.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. Activation strategies for biochar to use as an efficient catalyst in various applications. **Fuel**, v. 285, p. 119205, 2021.

ARAVIND, S.; KUMAR, P. S.; KUMAR, N. S.; SIDDARTH, N. Conversion of green algal biomass into bioenergy by pyrolysis. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 829–849, 2020.

BALAJI, M.; NIJU, S. Biochar - derived heterogeneous catalysts for biodiesel production. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 4, p. 1447–1469, 2019.

BANERJEE, S.; ROUT, S.; BANERJEE, S.; ATTA, A.; DAS, D. Fe₂O₃ nanocatalyst aided transesterification for biodiesel production from lipid-intact wet microalgal biomass: A biorefinery approach. **Energy Conversion and Management**, v. 195, p. 844–853, 2019.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973.

BERGNA, D.; VARILA, T.; ROMAR, H.; LASSI, U. Comparison of the Properties of Activated Carbons Produced in One-Stage and Two-Stage Processes. **Journal of Carbon Research**, v. 4, n. 3, p. 41, 2018.

BHALAMURUGAN, G. L.; VALERIE, O.; MARK, L. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. **Environmental Engineering Research**, v. 23, n. 3, p. 229–241, 2018.

BHATTACHARYA, M.; GOSWAMI, S. Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101580, 2020.

BINDA, G.; SPANU, D.; BETTINETTI, R.; MAGAGNIN, L.; POZZI, A.; DOSSI, C. Comprehensive comparison of microalgae-derived biochar from different feedstocks: A prospective study for future environmental applications. **Algal Research**, v. 52, p. 102103, 2020.

BIRD, M. I.; WURSTER, C. M.; DE PAULA SILVA, P. H.; BASS, A. M.; DE NYS, R. Algal biochar - production and properties. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1886–1891, 2011.

BITOG, J. P.; LEE, I. B.; LEE, C. G.; KIM, K. S.; HWANG, H. S.; HONG, S. W.; SEO, I. H.; KWON, K. S.; MOSTAFA, E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 131–147, 2011.

BLACKBURN, K. B. **A reinvestigation of the alga Botryococcus braunii Kiitzing**. Edinburgh: Trans. Roy. Soc., 1936. p.841–854

BLIFERNEZ-KLASSEN, O.; CHAUDHARI, S.; KLASSEN, V.; WÖRDENWEBER, R.; STEFFENS, T.; CHOLEWA, D.; NIEHAUS, K.; KALINOWSKI, J.; KRUSE, O. Metabolic survey of Botryococcus braunii: Impact of the physiological state on product formation. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–23, 2018.

BOUYAHIA, C.; RAHMANI, M.; BENSEMLALI, M.; EL HAJJAJI, S.; SLAOU, M.; BENCHEIKH, I.; AZOULAY, K.; LABJAR, N. Influence of extraction techniques on the adsorption capacity of methylene blue on sawdust: Optimization by full factorial design. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 6, p. 114–123, 2023.

BRANCO, K. B. Z. F.; BALMANT, W.; TREVISAN, E.; TAHER, D. M.; MARIANO, A. B.; ARROYO, P. A. Phenomenological modeling of Acutodesmus obliquus microalgae in situ transesterification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 154, p. 107434, 2020.

BRASIL, B. S. A. .; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, 2016.

BREDDA, E. H.; MOLGERO DA RÓS, P. C.; PEDRO, G. A.; CASTRO, H. F. De; SILVA, M. B. Nannochloropsis gaditana and Dunaliella salina as Feedstock for Biodiesel Production: Lipid Production and Biofuel Quality. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 1–10, 2019.

BREDDA, E. H.; MUNIZ, J.; MOLGERO, P. C.; AMARAL, M. S.; SILVA, M. B.; LOURES, C. C. A. Evaluation of oil productivity of Chlorella minutissima cultivated in two homemade photobioreactors (bubble column and tank). **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 11, p. 6060–6066, 2016.

CARVALHO, A. K. F.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; SILVA, J. P. V.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel production from Mucor circinelloides using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. **Fuel**, v. 202, p. 503–511, 2017.

CASTANHEIRO, J. E.; VITAL, J.; FONSECA, I. M.; RAMOS, A. M. Glycerol conversion into biofuel additives by acetalization with pentanal over heteropolyacids immobilized on zeolites. **Catalysis Today**, v. 346, p. 76–80, 2020.

CHAGAS, B. M. E. de E. **Pirólise rápida da cianobactéria Spirulina para produção de biocombustíveis e químicos**. 135p. Tese (Doutorado) -

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

CHAIWONG, K.; KIATSIRIROAT, T.; VORAYOS, N.; THARARAX, C. Biochar production from freshwater algae by slow pyrolysis Kanyaporn. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 01, n. 2, p. 178–183, 2012.

CHAIWONG, K.; KIATSIRIROAT, T.; VORAYOS, N.; THARARAX, C. Study of bio-oil and bio-char production from algae by slow pyrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 600–606, 2013a.

CHAIWONG, K.; KIATSIRIROAT, T.; VORAYOS, N.; THARARAX, C. Study of bio-oil and bio-char production from algae by slow pyrolysis. v. 6, p. 1–7, 2013b.

CHAKRABORTY, I.; BHOWMICK, G. D.; GHOSH, D.; DUBEY, B. K.; PRADHAN, D.; GHANGREKAR, M. M. Novel low-cost activated algal biochar as a cathode catalyst for improving performance of microbial fuel cell. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 42, p. 100808, 2020.

CHANG, Y. M.; TSAI, W. T.; LI, M. H. Characterization of activated carbon prepared from chlorella-based algal residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 344–348, 2014.

CHEN, B.; CHEN, Z.; LV, S. A novel magnetic biochar efficiently sorbs organic pollutants and phosphate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 716–723, 2011.

CHEN, C. Y.; ZHAO, X. Q.; YEN, H. W.; HO, S. H.; CHENG, C. L.; LEE, D. J.; BAI, F. W.; CHANG, J. S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

CHI, N. T. L.; ANTO, S.; AHAMED, T. S.; KUMAR, S. S.; SHANMUGAM, S.; SAMUEL, M. S.; MATHIMANI, T.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. A review on biochar production techniques and biochar based catalyst for biofuel production from algae. **Fuel**, v. 287, p. 119411, 2021.

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

CHOI, Y. K.; CHOI, T. R.; GURAV, R.; BHATIA, S. K.; PARK, Y. L.; KIM, H. J.; KAN, E.; YANG, Y. H. Adsorption behavior of tetracycline onto *Spirulina* sp. (microalgae)-derived biochars produced at different temperatures. **Science of the Total Environment**, v. 710, p. 136282, 2020.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the Edible Microorganism. **Microbiological Review**, v. 47, n. 4, p. 551–578, 1983.

COELHO, D. de F.; TUNDISI, L. L.; CERQUEIRA, K. S.; RODRIGUES, J. R. da S.; MAZZOLA, P. G.; TAMBOURGI, E. B.; SOUZA, R. R. de. Microalgae: Cultivation

Aspects and Bioactive Compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180343, 2019.

COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. London: Taylor& Francis, 1999. 419 p.

CONCEIÇÃO, L. R. V. da; CARNEIRO, L. M.; GIORDANI, D. S.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of biodiesel from macaw palm oil using mesoporous solid catalyst comprising 12-molybdophosphoric acid and niobia. **Renewable Energy**, v. 113, p. 119–128, 2017.

COOK, C.; DAYANANDA, C.; TENNANT, R. K.; LOVE, J. Third-Generation Biofuels from the Microalga, *Botryococcus braunii*. **Biofuels and Bioenergy**, v. 1, p. 157–171, 2017.

CORDEIRO, C. S.; ROSA, F.; WYPYCH, F.; RAMOS, P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 477–486, 2011.

DAI, Y.; ZHANG, N.; XING, C.; CUI, Q.; SUN, Q. The adsorption, regeneration and engineering applications of biochar for removal organic pollutants: A review. **Chemosphere**, v. 223, p. 12–27, 2019.

DAS, D.; ROUT, P. K. Synthesis of Inorganic Polymeric Materials from Industrial Solid Waste. **Silicon**, v. 15, p. 1771–1791, 2022.

DASSEY, A. J.; HALL, S. G.; THEEGALA, C. S. An analysis of energy consumption for algal biodiesel production: Comparing the literature with current estimates. **Algal Research**, v. 4, n. 1, p. 89–95, 2014.

DE LUNA, M. D. G.; DOLIENTE, L. M. T.; IDO, A. L.; CHUNG, T. W. In situ transesterification of *Chlorella* sp. microalgae using LiOH-pumice catalyst. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2830–2835, 2017.

DE MORAES, N. P.; ANSELMO, R. B.; SARTOR, L. O.; DANTAS, G. V. J.; RODRIGUES, L. A.; CHAGURI E CARVALHO, L. Spray drying as feasible processing technique to enhance the photocatalytic activity of the Nb₂O₅/carbon xerogel composite. **Materials Letters**, v. 273, p. 127932, 2020.

DE MORAES, N. P.; SILVA, F. N.; DA SILVA, M. L. C. P.; CAMPOS, T. M. B.; THIM, G. P.; RODRIGUES, L. A. Methylene blue photodegradation employing hexagonal prism-shaped niobium oxide as heterogeneous catalyst: Effect of catalyst dosage, dye concentration, and radiation source. **Materials Chemistry and Physics**, v. 214, p. 95–106, 2018.

DEHKHODA, A. M.; WEST, A. H.; ELLIS, N. Biochar based solid acid catalyst for biodiesel production. **Applied Catalysis A: General**, v. 382, n. 2, p. 197–204, 2010.

DONG, T.; GAO, D.; MIAO, C.; YU, X.; DEGAN, C.; GARCIA-PÉREZ, M.; RASCO, B.; SABLANI, S. S.; CHEN, S. Two-step microalgal biodiesel production using acidic catalyst generated from pyrolysis-derived bio-char. **Energy Conversion and Management**, v. 105, p. 1389–1396, 2015.

DOS SANTOS, R. R.; ARAÚJO, O. de Q. F.; DE MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 2016.

DOS SANTOS, W. R.; TAGLIAFERRO, G. V.; DOS SANTOS, J. C.; PEREIRA, P.; ROMA, C.; SILVA, M. B.; GUIMARÃES, D. H. P. Semi-continuous Cultivation of *Chlorella minutissima* in Landfill Leachate: Effect of Process Variables on Biomass Composition. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, n. 3, p. 1627–1638, 2022.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, 2010.

FANG, Z.; SMITH, R. L.; LI, H. **Production of Biofuels and Chemicals with Bifunctional Catalysts**. 1. ed. Singapore: Springer Singapore, 2017.

FERREIRA, P.; FONSECA, I. M.; RAMOS, A. M.; VITAL, J.; CASTANHEIRO, J. E. Acetylation of glycerol over heteropolyacids supported on activated carbon. **Catalysis Communications**, v. 12, n. 7, p. 573–576, 2011.

FIGUEIRA, F. da S. **Purificação de c-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 141p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

FONSECA, J. M.; SPESSATO, L.; CAZETTA, A. L.; DA SILVA, C.; ALMEIDA, V. de C. Sulfonated carbon: synthesis, properties and production of biodiesel. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 170, p. 108668, 2022.

FU, X.; LI, D.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; HUANG, W.; ZHU, Y.; YANG, J. A microalgae residue based carbon solid acid catalyst for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 767–770, 2013.

GAN, Y. Y.; ONG, H. C.; SHOW, P. L.; LING, T. C.; CHEN, W. H.; YU, K. L.; ABDULLAH, R. Torrefaction of microalgal biochar as potential coal fuel and application as bio-adsorbent. **Energy Conversion and Management**, v. 165, p. 152–162, 2018.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 136p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GE, Y.; ZHU, S.; CHANG, J. S.; JIN, C.; HO, S. H. Immobilization of Hg(II) on high-salinity *Spirulina* residue-induced biochar from aqueous solutions: Sorption and transformation mechanisms by the dual-mode isotherms. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 115087, 2020.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; DAS, D. Process intensification of biodiesel production from *Chlorella* sp. MJ 11/11 by single step transesterification. **Algal Research**, v. 27, p. 12–20, 2017.

GO, A. W.; SUTANTO, S.; ONG, L. K.; TRAN-NGUYEN, P. L.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Developments in in-situ (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 284–305, 2016.

GONG, X.; ZHANG, B.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; XU, M. Investigation on pyrolysis of low lipid microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*. **Energy and Fuels**, v. 28, p. 95–103, 2014.

GRIERSON, S.; STREZOV, V.; SHAH, P. Properties of oil and char derived from slow pyrolysis of *Tetraselmis chui*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8232–8240, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-Green Algae With Chlorophyllide C_{1,2}. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10–14, 1972.

GULDHE, A.; MOURA, C. V. R.; SINGH, P.; RAWAT, I.; MOURA, E. M.; SHARMA, Y.; BUX, F. Conversion of microalgal lipids to biodiesel using chromium-aluminum mixed oxide as a heterogeneous solid acid catalyst. **Renewable Energy**, v. 105, p. 175–182, 2017a.

GULDHE, A.; SINGH, P.; ANSARI, F. A.; SINGH, B.; BUX, F. Biodiesel synthesis from microalgal lipids using tungstated zirconia as a heterogeneous acid catalyst and its comparison with homogeneous acid and enzyme catalysts. **Fuel**, v. 187, p. 180–188, 2017b.

GUMEROVA, N. I.; ROMPEL, A. Synthesis, structures and applications of electron-rich polyoxometalates. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, n. 2, 2018.

GUO, F.; FANG, Z.; TIAN, X. F.; LONG, Y. D.; JIANG, L. Q. One-step production of biodiesel from *Jatropha* oil with high-acid value in ionic liquids. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 447–450, 2013.

GWENZI, W.; CHAUKURA, N.; NOUBACTEP, C.; MUKOME, F. N. D. Biochar-based water treatment systems as a potential low-cost and sustainable technology for clean water provision. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 732–749, 2017.

HEIDARINEJAD, Z.; DEHGHANI, M. H.; HEIDARI, M.; JAVEDAN, G.; ALI, I.; SILLANPÄÄ, M. Methods for preparation and activation of activated carbon: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 393–415, 2020.

HELMI, M.; TAHVILDARI, K.; HEMMATI, A.; ABEROOMAND AZAR, P.; SAFEKORDI, A. Phosphomolybdic acid/graphene oxide as novel green catalyst using for biodiesel production from waste cooking oil via electrolysis method: Optimization using with response surface methodology (RSM). **Fuel**, v. 287, p. 119528, 2021.

HERNANDEZ-MONTOYA, V.; GARCA-SERVIN, J.; BUENO-LOPEZ, J. I. Thermal Treatments and Activation Procedures Used in the Preparation of Activated Carbons. In: HERNANDEZ-MONTOYA, V. **Lignocellulosic Precursors Used in the Synthesis of Activated Carbon - Characterization Techniques and Applications in the Wastewater Treatment**. Croatia: InTech, 2012. p. 102.

HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; SCHOBBER, S.; MITTELBACH, M.; NAVIA, R. Improving the FAME Yield of in Situ Transesterification from Microalgal Biomass through Particle Size Reduction and Cosolvent Incorporation. **Energy & Fuels**, v.

29, p. 823–832, 2015a.

HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; SCHOBER, S.; MITTELBAACH, M.; NAVIA, R. Biodiesel synthesis by direct transesterification of microalga *Botryococcus braunii* with continuous methanol reflux. **Bioresource technology**, v. 181, p. 32–9, abr. 2015b.

HO, S. H.; CHEN, Y. di; LI, R.; ZHANG, C.; GE, Y.; CAO, G.; MA, M.; DUAN, X.; WANG, S.; REN, N. qi. N-doped graphitic biochars from C-phycoyanin extracted *Spirulina* residue for catalytic persulfate activation toward nonradical disinfection and organic oxidation. **Water Research**, v. 159, p. 77–86, 2019.

HUSILLOS RODRÍGUEZ, N.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, S.; BLANCO-VARELA, M. T. Activated carbon as an alternative fuel. Effect of carbon ash on cement clinkerization. **Journal of Cleaner Production**, v. 119, p. 50–58, 2016.

ISAZA-PÉREZ, F.; RAMÍREZ-CARMONA, M.; RENDÓN-CASTRILLÓN, L.; OCAMPO-LÓPEZ, C. Potential of residual fungal biomass: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 12, p. 13019–13031, 2020.

ISHIMATSU, A.; MATSUURA, H.; SANO, T.; KAYA, K.; WATANABE, M. M. Biosynthesis of Isoprene Units in the C34 Botryococcene Molecule Produced by *Botryococcus Braunii* Strain Bot-22. **Procedia Environmental Sciences**, v. 15, p. 56–65, 2012.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 4, p. 1312–1320, 2010.

JENA, U.; DAS, K. C. Comparative Evaluation of Thermochemical Liquefaction and Pyrolysis for Bio-Oil Production from Microalgae. **Energy & Fuels**, v. 25, p. 5472–5482, 2011.

JIN, J.; DUPRÉ, C.; YONEDA, K.; WATANABE, M. M.; LEGRAND, J.; GRIZEAU, D. Characteristics of extracellular hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* for biofuels production: Recent advances and opportunities. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1866–1875, 2016.

JO, Y. J.; LEE, O. K.; LEE, E. Y. Dimethyl carbonate-mediated lipid extraction and lipase-catalyzed in situ transesterification for simultaneous preparation of fatty acid methyl esters and glycerol carbonate from *Chlorella* sp. KR-1 biomass. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 105–110, 2014.

KARIMI, M. Exergy-based optimization of direct conversion of microalgae biomass to biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 141, p. 50–55, 2017.

KARPAGAM, R.; JAWAHARRAJ, K.; GNANAM, R. Review on integrated biofuel production from microalgal biomass through the outset of transesterification route: a cascade approach for sustainable bioenergy. **Science of the Total Environment**, v. 766, p. 144236, 2021.

KARSSA, T.; PAPINI, A.; KASAN, A. Cultivation of *Arthrospira* Strains in Tropical Conditions, with Particular Reference to Ethiopia. **International Journal of Food**

Science and Nutrition Engineering, v. 8, n. 5, p. 107–118, 2018.

KASTNER, J. R.; MILLER, J.; GELLER, D. P.; LOCKLIN, J.; KEITH, L. H.; JOHNSON, T. Catalytic esterification of fatty acids using solid acid catalysts generated from biochar and activated carbon. **Catalysis Today**, v. 190, n. 1, p. 122–132, 2012.

KAZEMIFARD, S.; NAYEBZADEH, H.; SAGHATOLESLAMI, N.; SAFAKISH, E. Application of magnetic alumina-ferric oxide nanocatalyst supported by KOH for in-situ transesterification of microalgae cultivated in wastewater medium. **Biomass and Bioenergy**, v. 129, p. 105338, 2019.

KIM, B.; HEO, H. Y.; SON, J.; YANG, J.; CHANG, Y. K.; LEE, J. H.; LEE, J. W. Simplifying biodiesel production from microalgae via wet in situ transesterification: A review in current research and future prospects. **Algal Research**, v. 41, p. 101557, 2019.

KIM, B.; IM, H.; LEE, J. W. In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. **Bioresource technology**, v. 185, p. 421–5, jun. 2015.

KIM, J. Y.; JUNG, J. M.; JUNG, S.; PARK, Y. K.; TSANG, Y. F.; LIN, K. Y. A.; CHOI, Y. E.; KWON, E. E. Biodiesel from microalgae: Recent progress and key challenges. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 93, p. 101020, 2022.

KONWAR, L. J.; BORO, J.; DEKA, D. Review on latest developments in biodiesel production using carbon-based catalysts. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 546–564, 2014.

KOZHEVNIKOV, I. V. **Catalysts for Fine Chemical Synthesis, Catalysis by Polyoxometalates**. 2nd. ed. London: John Wiley & Sons Ltd., 2002. 220 p.

KOZHEVNIKOV, I. V. Catalysis by Heteropoly Acids and Multicomponent Polyoxometalates in Liquid-Phase Reactions. **Chemical Reviews**, v. 2665, n. 96, 1998.

KUMAR, A.; MOHANTY, V.; YASHASWINI, P. Development of high protein nutrition bar enriched with spirulina plantensis for undernourished children. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 6, n. 3, p. 835–844, 2018.

KUMAR, D.; SINGH, B. Algal biorefinery: An integrated approach for sustainable biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 131, p. 105398, 2019.

LATHIYA, D. R.; BHATT, D. V.; MAHERIA, K. C. Synthesis of sulfonated carbon catalyst from waste orange peel for cost effective biodiesel production. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 69–76, 2018.

LAW, X. N.; CHEAH, W. Y.; CHEW, K. W.; IBRAHIM, M. F.; PARK, Y. K.; HO, S. H.; SHOW, P. L. Microalgal-based biochar in wastewater remediation: Its synthesis, characterization and applications. **Environmental Research**, v. 204, p. 111966, 2022.

LEE, J.; JUNG, J. M.; OH, J. I.; OK, Y. S.; LEE, S. R.; KWON, E. E. Evaluating the

effectiveness of various biochars as porous media for biodiesel synthesis via pseudo-catalytic transesterification. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 59–64, 2017.

LEE, J.; KIM, K. H.; KWON, E. E. Biochar as a Catalyst. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 70–79, 2017.

LEE, J.; KWON, E. E.; PARK, Y. K. Recent advances in the catalytic pyrolysis of microalgae. **Catalysis Today**, v. 355, p. 263–271, 2019.

LEE, J. W. Y.; CHIA, W. Y.; ONG, W. J.; CHEAH, W. Y.; LIM, S. S.; CHEW, K. W. Advances in catalytic transesterification routes for biodiesel production using microalgae. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 52, p. 102336, 2022.

LEE, X. J.; ONG, H. C.; GAN, Y. Y.; CHEN, W. H.; MAHLIA, T. M. I. State of art review on conventional and advanced pyrolysis of macroalgae and microalgae for biochar, bio-oil and bio-syngas production. **Energy Conversion and Management**, v. 210, p. 112707, 2020.

LEFEBVRE, F.; DUPONT, P.; AUROUX, A. Study of the acidity of H3PW12O40 supported on activated carbon by microcalorimetry and methanol dehydration reaction. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 55, p. 3–9, 1995.

LEMÕES, J. S. **Síntese de Ésteres Graxos de *Chlorella sp.* utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação in situ**. 2011. 70p. Dissertação (Mestrado em química tecnológica e ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

LENG, L.; XIONG, Q.; YANG, L.; LI, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, W.; JIANG, S.; LI, H.; HUANG, H. An overview on engineering the surface area and porosity of biochar. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 144204, 2021.

LEVINE, I. A. Algae: A way of life and health. *In*: LEVINE, I. A.; FLEURENCE, J. **Microalgae in Health and Disease Prevention**. Augusta: Academic Press, 2018. p. 1–10.

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

LI, D. C.; JIANG, H. The thermochemical conversion of non-lignocellulosic biomass to form biochar: A review on characterizations and mechanism elucidation. **Bioresource Technology**, v. 246, p. 57–68, 2017.

LI, Y.; LIAN, S.; TONG, D.; SONG, R.; YANG, W.; FAN, Y.; QING, R.; HU, C. One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis sp.* on solid base Mg-Zr catalyst. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3313–3317, 2011.

LILLO-RÓDENAS, M. A.; CAZORLA-AMORÓS, D.; LINARES-SOLANO, A. Understanding chemical reactions between carbons and NaOH and KOH: An insight into the chemical activation mechanism. **Carbon**, v. 41, n. 2, p. 267–275, 2003.

LIMA, M. C. **Síntese e caracterização de materiais baseados em heteropoliácido para aplicação em catálise**. 61p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

LIU, W. J.; JIANG, H.; YU, H. Q. Development of Biochar-Based Functional Materials: Toward a Sustainable Platform Carbon Material. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 22, p. 12251–12285, 2015.

LOEWUS, F. A.; TANNER, W. Plant Carbohydrates I - Intracellular Carbohydrates. *In*: LOEWUS, F. A.; TANNER, W. **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Springer, 1982. p. 401–415.

LOH, S. H.; CHEN, M. K.; FAUZI, N. S.; AZIZ, A.; CHA, T. S. Enhanced fatty acid methyl esters recovery through a simple and rapid direct transesterification of freshly harvested biomass of *Chlorella vulgaris* and *Messastrum gracile*. **Nature**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.

LONG, Y. D.; FANG, Z.; SU, T. C.; YANG, Q. Co-production of biodiesel and hydrogen from rapeseed and *Jatropha* oils with sodium silicate and Ni catalysts. **Applied Energy**, v. 113, p. 1819–1825, 2014.

LOONG, T. C.; IDRIS, A. One step transesterification of biodiesel production using simultaneous cooling and microwave heating. **Journal of Cleaner Production**, v. 146, p. 57–62, 2016.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. 588 p.

LOURES, C. C. A. **Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2016. 153p. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

LOURES, C. C. A.; AMARAL, M. S.; DA RÓS, P. C. M.; ZORN, S. M. F. E.; DE CASTRO, H. F.; SILVA, M. B. Simultaneous esterification and transesterification of microbial oil from *Chlorella minutissima* by acid catalysis route: A comparison between homogeneous and heterogeneous catalysts. **Fuel**, v. 211, p. 261–268, 2018.

LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies: novel developments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 287–316, 2015.

MA, G.; HU, W.; PEI, H.; JIANG, L.; JI, Y.; MU, R. Study of KOH/Al₂O₃ as heterogeneous catalyst for biodiesel production via in situ transesterification from microalgae. **Environmental Technology**, v. 36, n. 5, p. 622–627, 4 mar. 2015.

MA, Y.; WANG, P.; WANG, Y.; LIU, S.; WANG, Q.; WANG, Y. Fermentable sugar production from wet microalgae residual after biodiesel production assisted by radio frequency heating. **Renewable Energy**, v. 155, p. 827–836, 2020.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; ROBLES-MEDINA, A.; JIMÉNEZ-CALLEJÓN, M. J.;

HITA-PEÑA, E.; ESTÉBAN-CERDÁN, L.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; NAVARRO-LÓPEZ, E.; MOLINA-GRIMA, E. Optimization of biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification using the surface response methodology. **Renewable Energy**, v. 129, p. 141–149, 2018.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631–645, 2012.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. **Energies**, v. 6, n. 8, p. 3937–3950, 2013.

MATSUDO, M. C.; SATO, S.; PEREGO, P.; BEZERRA, R. P.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 52–57, 2008.

MENEZES, R. S.; SOARES, A. T.; MARQUES JÚNIOR, J. G.; LOPES, R. G.; DA ARANTES, R. F.; DERNER, R. B.; FILHO, N. R. A. Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var. *minor*: a suitable microalga for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2679–2686, 2016.

METZGER, P.; LARGEAU, C. *Botryococcus braunii*: A rich source for hydrocarbons and related ether lipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 486–496, 2005.

METZGER, P.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Lipids and Macromolecular Lipids of the Hydrocarbon-Rich Microalga *Botryococcus braunii*. *In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

MIMOUNI, V.; COUZINET-MOSSION, A.; ULMANN, L.; WIELGOSZ-COLLIN, G. Lipids from microalgae. *In: LEVINE, I. A.; FLEURENCE, J. Microalgae in Health and Disease Prevention*. Lewiston: Academic Press, 2018. p. 109–131.

MOJOUDI, N.; MIRGHAFARI, N.; SOLEIMANI, M.; SHARIATMADARI, H.; BELVER, C.; BEDIA, J. Phenol adsorption on high microporous activated carbons prepared from oily sludge: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 8th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2013. 757 p.

MORAIS, E. G. de; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L.; MORAIS, M. G. de; COSTA, J. A. V. Glycerol increases growth, protein production and alters the fatty acids profile of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp LEB 18. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 40–45, 2019.

MORALES, M.; AFLALO, C.; BERNARD, O. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. **Biomass and Bioenergy**, v. 150, p. 106108, 2021.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. S. V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 493–506, 2017.

MORENO, E.; RAJAGOPAL, K. Challenges of catalysis acidity in solids. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 538–542, 2009.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y.-H. P. More Accurate Determination of Acid-Labile Carbohydrates in Lignocellulose by Modified Quantitative Saccharification. **Energy and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3684–3688, 2007.

NARKHEDE, N.; SINGH, S.; PATEL, A. Recent progress on supported polyoxometalates for biodiesel synthesis via esterification and transesterification. **Green Chemistry**, v. 17, p. 89–107, 2015.

NAROWSKA, B.; KUŁAŻYŃSKI, M.; ŁUKASZEWICZ, M.; BURCHACKA, E. Use of activated carbons as catalyst supports for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 135, p. 176–185, 2019.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Sustainable Development of Algal Biofuels in the United States**. Washington, D.C.: The National Academies Press, 2012. 246 p.

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Adsorptive removal of dye using biochar derived from residual algae after in-situ transesterification: Alternate use of waste of biodiesel industry. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 187–197, 2016.

NGUYEN, H. K. D.; PHAM, V. V.; DO, H. T. Preparation of Ni/biochar Catalyst for Hydrotreating of Bio-Oil from Microalgae Biomass. **Catalysis Letters**, v. 146, n. 11, p. 2381–2391, 2016.

NGUYEN, T. T.; LAM, M. K.; CHENG, Y. W.; UEMURA, Y.; MANSOR, N.; LIM, J. W.; SHOW, P. L.; TAN, I. S.; LIM, S. Reaction kinetic and thermodynamics studies for in-situ transesterification of wet microalgae paste to biodiesel. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 169, p. 250–264, 2021.

NGUYEN, T. T.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; MANSOR, N.; LIM, J. W.; SHOW, P. L.; TAN, I. S.; LIM, S. High biodiesel yield from wet microalgae paste via in-situ transesterification: Effect of reaction parameters towards the selectivity of fatty acid esters. **Fuel**, v. 272, p. 117718, 2020.

NIE, J.; SUN, Y.; ZHOU, Y.; KUMAR, M.; USMAN, M.; LI, J.; SHAO, J.; WANG, L.; TSANG, D. C. W. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods, and prospects for future research. **Science of the Total Environment**, v. 707, p. 136080, 2020.

NITSOS, C.; FILALI, R.; TAIDI, B.; LEMAIRE, J. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. **Biotechnology Advances**, v. 45, p. 107650, 2020.

ONU. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/7>. Acesso em: 23 jan. 2023.

OREGE, J. I.; ODERINDE, O.; KIFLE, G. A.; IBIKUNLE, A. A.; RAHEEM, S. A.; EJEROMEDOGHENE, O.; OKEKE, E. S.; OLUKOWI, O. M.; OREGÉ, O. B.; FAGBOHUN, E. O.; OGUNDIPE, T. O.; AVOR, E. P.; AJAYI, O. O.; DARAMOLA, M. O. Recent advances in heterogeneous catalysis for green biodiesel production by transesterification. **Energy Conversion and Management**, v. 258, p. 115406, 2022.

PARK, Y. M.; LEE, D. W.; KIM, D. K.; LEE, J. S.; LEE, K. Y. The heterogeneous catalyst system for the continuous conversion of free fatty acids in used vegetable oils for the production of biodiesel. **Catalysis Today**, v. 131, n. 1–4, p. 238–243, 2008.

PASA, T. L. B.; SOUZA, G. K.; DIÓRIO, A.; ARROYO, P. A.; PEREIRA, N. C. Assessment of commercial acidic ion-exchange resin for ethyl esters synthesis from *Acrocomia aculeata* (Macaúba) crude oil. **Renewable Energy**, v. 146, p. 469–476, 2020.

PATRA, B. R.; MUKHERJEE, A.; NANDA, S.; DALAI, A. K. Biochar production, activation and adsorptive applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, n. 0123456789, 2021.

PAVIA, D. L.; LAMPAMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.

PEDRO, G. A.; AMARAL, M. S.; PEREIRA, F. M.; FLUMIGNAN, D. L.; DA RÓS, P. C. M.; REIS, C. E. R.; SILVA, M. B. Highly Wet *Chlorella minutissima* Biomass for In Situ Biodiesel Production and Residual Biomass Rich in Labile Carbohydrates. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2021.

PENG, L.; REN, Y.; GU, J.; QIN, P.; ZENG, Q.; SHAO, J.; LEI, M.; CHAI, L. Iron improving bio-char derived from microalgae on removal of tetracycline from aqueous system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7631–7640, 2014.

PENG, W.; WU, Q.; TU, P. Effects of temperature and holding time on production of renewable fuels from pyrolysis of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 147–152, 2000.

PEREIRA, F. M.; LOURES, C. C. A.; AMARAL, M. S.; GOMES, F. M.; PEDRO, G. A.; MACHADO, M. A. G.; REIS, C. E. R.; SILVA, M. B. Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor. **Fuel**, v. 230, p. 155–162, 2018a.

PEREIRA, H.; PÁRAMO, J.; SILVA, J.; MARQUES, A.; BARROS, A.; MAURÍCIO, D.; SANTOS, T.; SCHULZE, P.; BARROS, R.; GOUVEIA, L.; BARREIRA, L.; VARELA, J. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: From an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018b.

PHAM, V. Van; KHANH, H.; NGUYEN, D. Study on characterization of Ni / Biochar catalyst derived from microalgal biomass. **Journal of Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 664–671, 2016.

PILONI, R. V.; FONTES COELHO, L.; SASS, D. C.; LANTERI, M.; ZAGHETE BERTOCHI, M. A.; LAURA MOYANO, E.; CONTIERO, J. Biochars from Spirulina as an alternative material in the purification of lactic acid from a fermentation broth. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, p. 100084, 2021.

POO, K. M.; SON, E. B.; CHANG, J. S.; REN, X.; CHOI, Y. J.; CHAE, K. J. Biochars derived from wasted marine macro-algae (*Saccharina japonica* and *Sargassum fusiforme*) and their potential for heavy metal removal in aqueous solution. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 364–372, 2018.

PRADO, R. G.; BIANCHI, M. L.; DA MOTA, E. G.; BRUM, S. S.; LOPES, J. H.; DA SILVA, M. J. H3PMo12O40/Agroindustry Waste Activated Carbon-Catalyzed Esterification of Lauric Acid with Methanol: A Renewable Catalytic Support. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 4, p. 669–679, 2018.

QU, S.; CHEN, C.; GUO, M.; JIANG, W.; LU, J.; YI, W.; DING, J. Microwave-assisted in-situ transesterification of *Spirulina platensis* to biodiesel using PEG/MgO/ZSM-5 magnetic catalyst. **Journal of Cleaner Production**, v. 311, p. 127490, 2021.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; NOVAIS, J. M. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 181–187, 1998.

REIS, C. E. R.; ZHANG, J.; HU, B. Lipid Accumulation by Pelletized Culture of *Mucor circinelloides* on Corn Stover Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 411–423, 2014.

REZA, M. S.; YUN, C. S.; AFROZE, S.; RADENAHMAD, N.; BAKAR, M. S. A.; SAIDUR, R.; TAWEEKUN, J.; AZAD, A. K. Preparation of activated carbon from biomass and its' applications in water and gas purification, a review. **Arab Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 27, n. 1, p. 208–238, 2020.

ROCHA, P. D.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. Sulfonated activated carbon from corn cobs as heterogeneous catalysts for biodiesel production using microwave-assisted transesterification. **Renewable Energy**, v. 143, p. 1710–1716, 2019.

RON SSE, F.; HECKE, S. Van; DICKINSON, D.; PRINS, W. Production and characterization of slow pyrolysis biochar : influence of feedstock type and pyrolysis conditions. **GCB Bioenergy**, v. 5, p. 104–115, 2013.

RUSSELL, C.; RODRIGUEZ, C.; YASEEN, M. Microalgae for lipid production: Cultivation, extraction & detection. **Algal Research**, v. 66, p. 102765, 2022.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-product-a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 1179–1198, 2016.

SANI, Y. M.; DAUD, W. M. A. W.; ABDUL AZIZ, A. R. Solid acid-catalyzed biodiesel production from microalgal oil - The dual advantage. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, p. 113–121, 2013.

SASSANO, C. E. N.; PEREGO, P.; SATO, S.; LMEIDA, K. A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L. A. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 8, p. 593–598, 2007.

SEKAR, M.; MATHIMANI, T.; ALAGUMALAI, A.; CHI, N. T. L.; DUC, P. A.; BHATIA, S. K.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. A review on the pyrolysis of algal biomass for biochar and bio-oil – Bottlenecks and scope. **Fuel**, v. 283, p. 119190, 2021.

SILVA, W. L. G.; SOUZA, P. T. De; SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M. Separation of the glycerol-biodiesel phases in an ethyl transesterification synthetic route using water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1745–1750, 2015.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629–1634, 2007.

SILVERSTEIN, M. R.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 1994.

SIMÃO, B. L.; CARDOSO, C. R.; ATAÍDE, C. H.; CHAGAS, B. M. E.; SANTANA JÚNIOR, J. A. Pyrolysis of *Spirulina maxima*: Kinetic modeling and selectivity for aromatic hydrocarbons. **Algal Research**, v. 32, p. 221–232, 2018.

SINGH, A.; SHARMA, R.; PANT, D.; MALAVIYA, P. Engineered algal biochar for contaminant remediation and electrochemical applications. **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145676, 2021.

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; GUMBYTE, M. Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae: a review. **Fuel Processing Technology**, v. 150, p. 78–87, 2016.

SONG, X.; LIU, B. F.; KONG, F.; REN, N. Q.; REN, H. Y. Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: Application, mechanisms and challenges. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 183, p. 106355, 2022.

SOTOUDEHNIAKARANI, F.; ALAYAT, A.; MCDONALD, A. G. Characterization and comparison of pyrolysis products from fast pyrolysis of commercial *Chlorella vulgaris* and cultivated microalgae. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 139, p. 258–273, 2019.

SOUZA, G. K.; SCHEUFELE, F. B.; PASA, T. L. B.; ARROYO, P. A.; PEREIRA, N. C. Synthesis of ethyl esters from crude macauba oil (*Acrocomia aculeata*) for biodiesel production. **Fuel**, v. 165, p. 360–366, 2016.

SOUZA, G. M.; VICTORIA, R. L.; JOLY, C. A.; VERDADE, L. M. **Bioenergy & Sustainability: bridging the gaps**. São Paulo: Áttema Editorial: Assessoria e Design, 2015. .

SUH, W. I.; MISHRA, S. K.; KIM, T.-H.; FAROOQ, W.; MOON, M.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S.; YANG, J.-W. Direct transesterification of wet microalgal biomass for preparation of biodiesel. **Algal Research**, v. 12, p. 405–411, nov. 2015.

SUN, J.; LI, Y.; MU, C.; WEI, J.; ZHAO, Y.; MA, X.; WANG, S. Supported heteropolyacids catalysts for the selective hydrocracking and isomerization of n-C16 to produce jet fuel. **Applied Catalysis A: General**, v. 598, p. 117556, 2020.

SUNG, M.; HAN, J. Ultrasound-assisted in-situ transesterification of wet *Aurantiochytrium* sp. KRS 101 using potassium carbonate. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 117–121, 2018.

TAGLIAFERRO, G. V.; IZÁRIO FILHO, H. J.; CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; SILVA, M. B.; SANTOS, J. C. dos. Continuous cultivation of *Chlorella minutissima* 26a in a tube-cylinder internal-loop airlift photobioreactor to support 3G biorefineries. **Renewable Energy**, v. 130, p. 439–445, 2019.

TAN, X. fei; LIU, S. bo; LIU, Y. guo; GU, Y. ling; ZENG, G. ming; HU, X. jiang; WANG, X.; LIU, S. heng; JIANG, L. hua. Biochar as potential sustainable precursors for activated carbon production: Multiple applications in environmental protection and energy storage. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 359–372, 2017.

TANABE, K.; MISONO, M.; HATTORI, H.; ONO, Y. **New solid acids and bases: their catalytic properties**. 1. ed. New York: Elsevier Science Publishers Company, 1989. 365 p.

TANG, Z.; LIM, S.; PANG, Y.; SHUIT, S.; ONG, H. Utilisation of biomass wastes based activated carbon supported heterogeneous acid catalyst for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 158, p. 91–102, 2020.

TAVANANDI, H. A.; MITTAL, R.; CHANDRASEKHAR, J.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, p. 239–251, 2018.

TAVANANDI, H. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Recovery of chlorophylls from spent biomass of *Arthrospira platensis* obtained after extraction of phycobiliproteins. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 391–401, 2019.

TOMASELLI, L. The Microalgae: with reference to mass-cultivation. *In*: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. p. 3–19.

TRAN, H. N.; TOMUL, F.; THI HOANG HA, N.; NGUYEN, D. T.; LIMA, E. C.; LE, G. T.; CHANG, C. T.; MASINDI, V.; WOO, S. H. Innovative spherical biochar for pharmaceutical removal from water: Insight into adsorption mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 394, p. 122255, 2020.

TREMILIOSI, G. C. **Estudo Comparativo de Catalisadores Ácidos para a**

Produção de Biodiesel. 77p. Dissertação (Mestrado em química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

TSUTSUMI, S.; SAITO, Y.; MATSUSHITA, Y.; AOKI, H. Prediction of hydrocarbon yield from wet *Botryococcus braunii*: The influences of colony surface charge and diameter on the amount of extractable hydrocarbon. **Fuel Processing Technology**, v. 176, p. 50–58, 2018.

UNFCCC/UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE. **United Nations Climate Change: Annual report 2021.** [s.l.] United Nations, 2022. Disponível em: https://unfccc.int/sites/default/files/resource/UNFCCC_Annual_Report_2021.pdf. Acesso em: 14 fev. 2023.

USHARANI, G.; SARANRAJ, P.; KANCHANA, D. Spirulina Cultivation: A Review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 3, n. 6, p. 1327–1341, 2012.

VAKROS, J. Biochars and their use as transesterification catalysts for biodiesel production: A short review. **Catalysts**, v. 8, n. 11, 2018.

VEGA-GUERRERO, D. B.; GÓMEZ-CASTRO, F. I.; LÓPEZ-MOLINA, A. Production of biodiesel with supercritical ethanol: Compromise between safety and costs. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 184, p. 79–89, 2022.

VICENTE, G.; CARRERO, A.; RODRÍGUEZ, R.; DEL PESO, G. L. Heterogeneous-catalysed direct transformation of microalga biomass into Biodiesel-Grade FAMES. **Fuel**, v. 200, p. 590–598, 2017.

VISIOLI, L. J.; DE CASTILHOS, F.; DA SILVA, C. Use of heterogeneous acid catalyst combined with pressurized conditions for esters production from macauba pulp oil and methyl acetate. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 65–74, 2019.

VÖLZ, M. D. de Á. **Óleos de alta acidez: desenvolvimento de um processo catalítico homogêneo.** 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em química tecnológica e ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, , 2009.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology.** [s.l.] Taylor & Francis, 1997. 252 p.

VYAVAHARE, G. D.; GURAV, R. G.; JADHAV, P. P.; PATIL, R. R.; AWARE, C. B.; JADHAV, J. P. Response surface methodology optimization for sorption of malachite green dye on sugarcane bagasse biochar and evaluating the residual dye for phyto and cytogenotoxicity. **Chemosphere**, v. 194, p. 306–315, 2018.

WANG, L.; WANG, Y.; MA, F.; TANKPA, V.; BAI, S.; GUO, X.; WANG, X. Mechanisms and reutilization of modified biochar used for removal of heavy metals from wastewater: A review. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 1298–1309, 2019.

XIONG, X.; YU, I. K. M.; CAO, L.; TSANG, D. C. W.; ZHANG, S.; OK, Y. S. A review

of biochar-based catalysts for chemical synthesis, biofuel production, and pollution control. **Bioresource Technology**, v. 246, p. 254–270, 2017.

YANG, C.; LI, R.; ZHANG, B.; QIU, Q.; WANG, B.; YANG, H.; DING, Y.; WANG, C. Pyrolysis of microalgae: A critical review. **Fuel Processing Technology**, v. 186, p. 53–72, 2019.

YANG, X.; WANG, X.; ZHAO, B.; LI, Y. Simulation Model of Pyrolysis Biofuel Yield Based on Algal Components and Pyrolysis Kinetics. **Bioenergy Research**, v. 7, p. 1293–1304, 2014.

ZAINAN, N. H.; SRIVATSA, S. C.; LI, F.; BHATTACHARYA, S. Quality of bio-oil from catalytic pyrolysis of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, v. 223, p. 12–19, 2018.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophyce'e. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photo-synthèse de *Spirulina maxima***. 1966. Tese (doutorado) - Université de Paris, Paris, 1966.

ZHANG, J.; SHAO, J.; JIN, Q.; LI, Z.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; CHEN, H. Sludge-based biochar activation to enhance Pb(II) adsorption. **Fuel**, v. 252, p. 101–108, 2019.

ZHENG, H.; GUO, W.; LI, S.; CHEN, Y.; WU, Q.; FENG, X.; YIN, R.; HO, S. H.; REN, N.; CHANG, J. S. Adsorption of p-nitrophenols (PNP) on microalgal biochar: Analysis of high adsorption capacity and mechanism. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1456–1464, 2017.

ZHOU, X.; ZHOU, J.; LIU, Y.; HE, Y.; REN, J.; GUO, J. Adsorption of endocrine disrupting ethylparaben from aqueous solution by chemically activated biochar developed from oil palm fibre. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 54, n. 5, p. 683–695, 2019.

ZHU, L.; YIN, S.; YIN, Q.; WANG, H.; WANG, S. Biochar: A new promising catalyst support using methanation as a probe reaction. **Energy Science and Engineering**, v. 3, p. 126–134, 2015.

ZHU, L.; ZHAO, N.; TONG, L.; LV, Y. Structural and adsorption characteristics of potassium carbonate activated biochar. **RSC Advances**, v. 8, n. 37, p. 21012–21019, 2018.

ZORN, S.; CARVALHO, A.; BENTO, H.; GAMBARATO, B.; PEDRO, G.; SILVA, A.; GONÇALVES, R.; RÓS, P. Da; SILVA, M. Use of fungal mycelium as biosupport in the formation of lichen - like structure: recovery of algal grown in sugarcane molasses for lipid accumulation and balanced fatty acid profile. **Membranes**, p. 1–14, 2022a.

ZORN, S. M. F. E.; DA SILVA, A. P. T.; BREDDA, E. H.; BENTO, H. B. S.; PEDRO, G. A.; CARVALHO, A. K. F.; SILVA, M. B.; DA RÓS, P. C. M. In Situ Transesterification of Microbial Biomass for Biolubricant Production Catalyzed by Heteropolyacid Supported on Niobium. **Energies**, v. 15, n. 4, p. 1591, 2022b.

ZORN, S. M. F. E.; PEDRO, G. A.; AMARAL, M. S.; LOURES, C. C. A.; SILVA, M. B. Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídios da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* via solventes. **Holos**, v. 2, p. 66, 2017.

ZORN, S. M. F. E.; REIS, C. E. R.; BENTO, H. B. S.; DE CARVALHO, A. K. F.; SILVA, M. B.; DE CASTRO, H. F. In Situ Transesterification of Marine Microalgae Biomass via Heterogeneous Acid Catalysis. **Bioenergy Research**, v. 13, p. 1260–1268, 2020.

ZUHARA, S.; PRADHAN, S.; MCKAY, G. Investigating mixed biosolids and cardboard for methylene blue adsorption: activation, adsorption modelling and thermodynamics. **Environmental Research**, v. 225, p. 143747, 2023.

APÊNDICE A - Propagação e colheita de cultivo de *B. braunii* e *S. maxima*

Durante a propagação de cultivo da *B. braunii* de 5 litros para 40 litros foram observadas adversidades tais como: a) autofloculação elevada, b) aparecimento de fungos na parte superior do fotobiorreator, c) contaminação por protozoário. Já durante os escalonamentos de 0,5 litro para 5 litros de *S. maxima* foram observadas adversidades tais como: a) lise das células nos primeiros dias de cultivo, b) perfil de crescimento sem definição, apenas tendência linear de crescimento e as vezes sem crescimento aparente; c) alteração da coloração do meio de cultivo de verde-azulada para amarelo-amarronzado; d) flotação das células. Em resumo, não foi possível estabelecer um cultivo apropriado da *B. braunii* e *S. maxima* para a produção de biomassa. Por consequência, foram estabelecidos parâmetros de cultivo que, em tese, estariam influenciando na adaptação do meio de cultivo na propagação: concentração inicial de células inoculadas, pH do meio, intensidade luminosa, e aeração.

A.1 Materiais e métodos

A.1.1 Ensaio de controle de pH

Buscou-se neste ensaio a investigação do controle do pH do meio Zarrouk. Para isto foram testados os pH iniciais do cultivo: pH 8,55 (pH obtido após a adição de todos os nutrientes), pH 9,0 (pH indicado para o cultivo de *Spirulina*) e pH 10,0. O pH foi corrigido utilizando solução de NaOH a 1N. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 500mL com volume útil de cultivo de 400 mL (água sanitizada com hipoclorito de sódio e neutralizada com tiosulfato de sódio), continuamente aerados e iluminados por uma lâmpada fluorescente de 40W, 800 lux, 24 h por dia. Todos os cultivos foram iniciados com ABS de 0,200 (aproximadamente 0,43 g.L⁻¹). Os ensaios foram finalizados no décimo dia de cultivo.

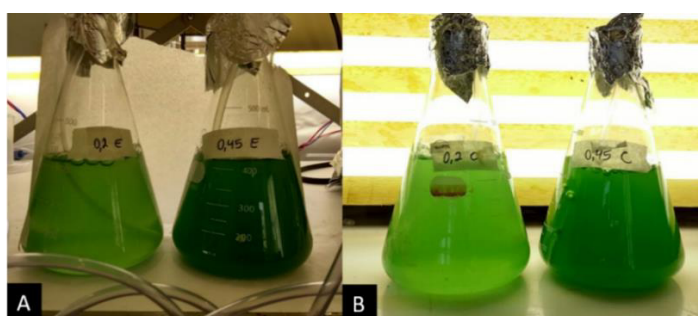
A.1.2 Ensaio de concentração inicial de células

Buscou-se com este ensaio investigar o efeito da concentração celular na inoculação de *S. maxima*. Para isto foram testadas, em meio Zarrouk padrão, duas concentrações iniciais de células: 0,100 e 0,450 de ABS, aproximadamente 0,4 g.L⁻¹ e 0,52 g.L⁻¹ respectivamente. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 1 litro com volume útil de 500 mL (água sanitizada com hipoclorito de sódio e neutralizada com tiosulfato de sódio), continuamente aerados e iluminados por uma lâmpada fluorescente de 40W, 800 lux, 24 h por dia. Os ensaios foram finalizados no décimo terceiro dia de cultivo.

A.1.3 Ensaio de Intensidade luminosa

Em vista da baixa taxa de crescimento em biorreatores de grande volume foi realizado ensaios com a variação de intensidade luminosa a fim de determinar a existência de fotoinibição nos cultivos. Para isto foram realizados ensaio com intensidade luminosa de 0,825 klux e 8,35 klux em duas concentrações iniciais (ABS): 0,200 e 0,450. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 500mL com volume útil de cultivo de 300 mL (água sanitizada com hipoclorito de sódio e neutralizada com tiosulfato de sódio), continuamente aerados e iluminados por lâmpadas fluorescentes (conforme a intensidade luminosa estudada), 24 h por dia. A Figura 52 apresenta os cultivos realizados nestes ensaios, onde o cultivo de baixa intensidade luminosa (Figura 52 A) teve a quantidade de lux controlada com bloqueio da incidência luminosa com o papel manteiga entre a lâmpada e o fotobiorreator.

Figura 52 - Cultivos de com diferentes intensidades luminosa: A) 0,825 klux e B) 8,35 klux



A.1.4 Adaptação da *S. maxima* a fontes de nutrientes

Frente a enorme quantidade de nutrientes até então utilizados para o cultivo de *Spirulina*, buscou-se a investigação de fontes alternativas de carbono e nitrogênio no meio de cultivo Zarrouk, bem como a redução da quantidade de nutrientes utilizadas. Para isto foram testados duas novas fontes de carbono: glicerol (1 mL.L^{-1} e 4 mL.L^{-1}) e acetato de sódio (17 g.L^{-1} , 4 g.L^{-1} e 1 g.L^{-1}), além da ureia comercial (fertilizante agrícola) como fonte de nitrogênio ($3,88 \text{ g.L}^{-1}$, $1,54 \text{ g.L}^{-1}$, 1 g.L^{-1} e $0,35 \text{ g.L}^{-1}$).

Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 500mL com volume útil de cultivo de 300 mL (água sanitizada com hipoclorito de sódio e neutralizada com tiosulfato de sódio), continuamente aerados e iluminados por lâmpadas fluorescentes de 40W, 6000 lux, 24 h por dia. A Figura 53 apresenta os cultivos realizados nestes ensaios. Todos os cultivos foram iniciados com ABS de 0,400 (aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$). Os ensaios foram finalizados no sétimo dia de cultivo e as amostras foram analisadas em microscópio para a avaliação da integridade celular da *S. maxima* frente ao meio de cultivo modificado.

Figura 53 - Cultivos realizados em erlenmeyer no teste de integridade celular para diferentes fontes de nutrientes



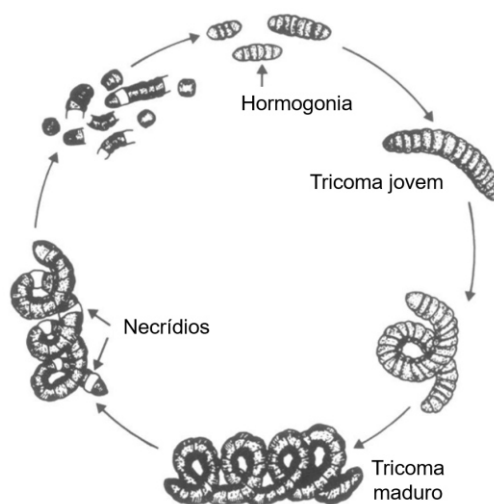
Fonte: Próprio autor

A.1.5 Análise de integridade celular

De maneira geral, as cepas saudáveis de *Spirulina* são caracterizadas pela presença numerosa de filamentos longos (tricoma maduro) e por filamentos curtos

(tricoma jovem) que dará origem a uma nova célula, como pode ser comparado na Figura 54 adaptada de Ciferri (1983) que apresenta o ciclo de vida da *Spirulina*. Assim é possível afirmar que na microfotografia de um cultivo saudável, existe uma numerosa quantidade de células longas e de tricomas em desenvolvimento (CIFERRI, 1983).

Figura 54 - Ciclo de vida da Spirulina



Fonte: Traduzido de Ciferri (1983)

A.1.6 Extração e determinação de ficocianina em cianobactérias

A extração da ficocianina foi realizada com a adição de 100 miligramas de biomassa seca em tubo falcon de 15 mL previamente preenchido com 12,5 mL de solução tampão de NaH_2PO_4 a 0,01M e NaCl a 0,15M (solução salina tamponada). A biomassa hidratada foi submetida a banho de ultrassom por 30 min e frequência de 50 kHz. Em seguida, a amostra foi submetida a um ciclo de congelamento e degelo: congelamento por 24 h, degelo da suspensão até atingir a temperatura ambiente, congelamento por mais 24 h, e novo degelo até temperatura ambiente, mantido por 24 h em geladeira. Após o ciclo de congelamento e degelo, a suspensão foi, então, centrifugada a 3500 rpm por 40 min. Posterior a centrifugação, o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda em 615 nm e 652 nm, utilizando-se a solução tampão como branco. A concentração de ficocianina (BENNETT; BOGORAD, 1973) foi definida pela equação (11):

$$CF = \frac{DO_{615nm} - 0,474 \cdot (DO_{652nm})}{5,34} \quad (11)$$

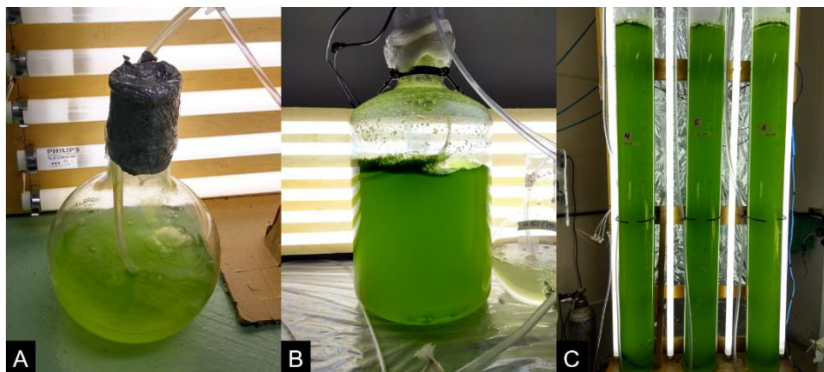
Onde CF é a concentração de ficocianina ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), DO_{615nm} é a densidade óptica da amostra em 615 nm, e DO_{652nm} é a densidade óptica da amostra em 652nm.

A.2 Resultados

A.2.1 Propagação do cultivo da *B. braunii*

As propagações dos cultivos de *B. braunii* para a produção de biomassa apresentaram baixas dificuldades quanto a adaptação das células às configurações dos fotobiorreatores utilizados. O escalonamento é apresentado na Figura 55, partindo de cultivos de 1 litro (Figura 55 A) aos cultivos de 10 litros (Figura 55 B), e finalmente para os cultivos realizados nos fotobiorreatores de colunas de bolhas de 40 litros cada (Figura 55 C).

Figura 55 - Escalonamento dos cultivos de *B. braunii*: A) fotobiorreator de 1 L, B) fotobiorreator de 10 L, C) fotobiorreator de 40 L.



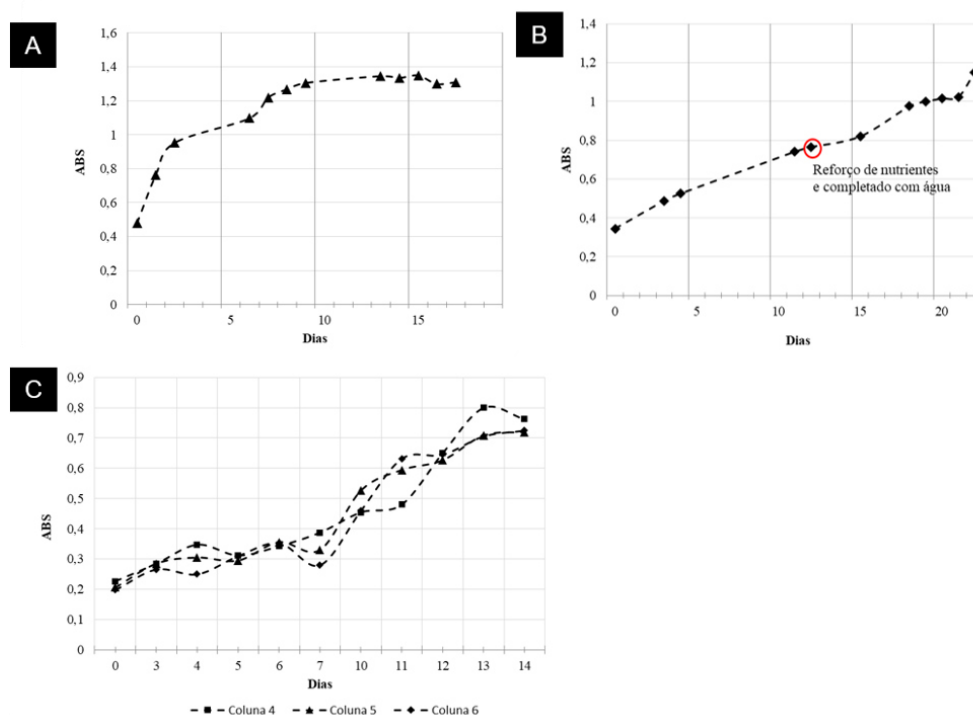
Fonte: Próprio autor

As curvas de crescimento da microalga *B. braunii* em cada fotobiorreator do escalonamento são apresentadas na Figura 56. Em geral, a *B. braunii* demonstra uma baixa taxa de crescimento (JIN *et al.*, 2016), como pode ser confirmado nas curvas de crescimento obtidas. Nos cultivos de 1 litro (Figura 56 A) foi possível identificar as fases exponencial nos primeiros dias de cultivo, atingindo

a fase estacionária próximos ao 9º e 10º dia de cultivo (ABS máxima de 1,3), e início do decaimento a partir do 16º dia de cultivo. Porém, o perfil de crescimento na propagação para 10 e 40 litros (Figura 56 B e C) não se teve definição das fases de crescimento esperado, possivelmente dada a configuração e incidência de luminosidade em cada fotobiorreator.

No cultivo de 10 litros de volume (Figura 56 B) foi observado um perfil praticamente linear de crescimento. Mesmo com um reforço de nutrientes no 13º dia de cultivo, o cultivo atingiu um máximo de ABS de 1,1 após 22 dias de cultivo, valor abaixo do obtido no cultivo de 1 litro. Para os cultivos escalonados em 40 litros (Figura 56 C), as ABS máximas obtidas variam entre 0,7 e 0,8, valores bem inferiores comparados aos obtidos no cultivo de 1 litro. Atribui-se a diferença de concentração celular máxima nas fases de escalonamento às diferentes configurações e incidência luminosa dos fotobiorreatores utilizados, onde cada um possuiu formato e diâmetro diferentes, assim o efeito do auto-sombreamento das células variou em cada fotobiorreator.

Figura 56 - Perfil de crescimento da *B. braunii* em cultivos de: A) 1 litro, B) 10 litros e C) 40 litros.



Fonte: Próprio autor

A.2.1.1 Adversidades na propagação de *B. braunii*

Durante os escalonamentos dos cultivos de *B. braunii* ocorreram pequenas adversidades tais como: a) autofloculação elevada, b) aparecimento de fungos na parte superior do fotobiorreator, c) contaminação por protozoário. Por conta da característica fisiológica da microalga *B. braunii* de formar colônias celulares, as mesmas atingem massa específica elevada acarretando na autofloculação do cultivo (Figura 57). Mesmo em altas vazões de aeração, a quantidade de biomassa floculada aumenta conforme a replicação celular. Devido a autofloculação, notou-se uma grande quantidade de células mortas na parte inferior do fotobiorreator que, em alguns casos, acarretou no comprometimento do cultivo. Esta adversidade foi remediada com a agitação manual diária para a ressuspensão das células.

Figura 57 - Autofloculação dos cultivos de *B. braunii*.



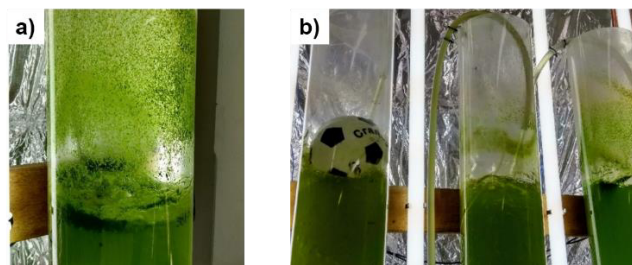
Fonte: Próprio autor

Nos cultivos de 40 litros ocorreu o aparecimento de fungos na parte superior do fotobiorreator de coluna. Devido à alta aeração empregada para diminuir o efeito da autofloculação, o estouro das bolhas de aeração gerou respingos de cultivo nas paredes do fotobiorreator (Figura 58 A). Após a secagem dos respingos, foi observado o aparecimento de mofo acinzentado o qual foi responsável pela contaminação e comprometimento de todos os fotobiorreatores.

Tal adversidade foi contornada com a colocação de bolas infláveis o qual ocupou a maior parte da seção transversal da coluna, além de acompanhar o nível conforme a perda de água por evaporação. Com a colocação das bolas infláveis, obteve-se a quebra das bolhas de aeração e, assim, a diminuição da quantidade de respingos de cultivo na parte superior do fotobiorreator. Na Figura 58 B é apresentada as colunas do fotobiorreator com e sem a inserção da bola inflável, no

qual é notória a diminuição da incidência de respingos com a inserção da bola inflável sob o cultivo.

Figura 58 - Fotobiorreatores dos cultivos de *B. braunii*: a) respingos na parte superior b) com e sem a inserção da bola inflável.

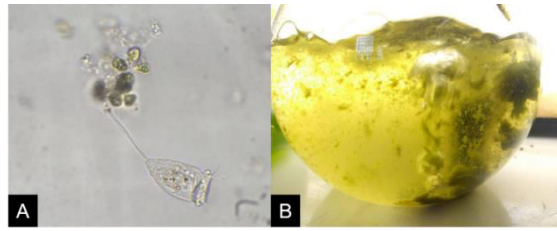


Fonte: Próprio autor

Além das adversidades apresentadas, nos acompanhamentos esporádicos de microfotografia dos cultivos foram encontrados microrganismos contaminantes. Os relatos de contaminação de cultivos por *Lycrymanis sp.*, *Colpidium sp.*, e *Vorticella sp.*, não tiveram efeito significativo no crescimento das microalgas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2012). Segundo Pereira *et al.* (2018), o aparecimento de contaminantes não fotossintéticos são comuns no aumento de escala, no entanto, algumas espécies de microalgas não são suscetíveis a predadores, como no estudo realizado pelo autor, onde a produção em larga escala de *Tetraselmis sp* (clorofita de água doce), a contaminação por *Vorticella* (um protozoário ciliado não teve impacto severo na produtividade ou dominação do cultivo.

No cultivo de *B. braunii*, foi observado poucas células de contaminação por alguma espécie de *Vorticella* (Figura 59), até então, sem indicativos de predação das células de *B. braunii*. No entanto, foi observado um aumento significativo das células do protozoário no decorrer da manutenção do inóculo e produção de biomassa, aumentando o risco de dominação dos cultivos e um impacto na produtividade da biomassa da microalga. Assim fez-se a parada imediata dos cultivos, limpeza e sanitização dos materiais, sanitização da água com maior concentração de hipoclorito de sódio, e renovação frequente dos inóculos com células oriundas do cepário.

Figura 59 - Contaminação nos cultivos de *B. braunii*: A) célula *Vorticella*, B) competição.



Fonte: Próprio autor

A.2.2 Propagação do cultivo da *S. maxima*

A.2.2.1 Ensaio de controle de pH

Nos ensaios dos cultivos com controle de pH, foram investigados o efeito de três pH iniciais para o cultivo da *S. maxima*. Os resultados após de dez dias cultivos são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Resultados da ABS dos cultivos iniciados em pH diferentes.

Ensaio	ABS Final
Exp. 1 (pH = 8,55)	1,13
Exp. 2 (pH = 9,00)	1,05
Exp. 3 (pH = 10,0)	1,30

Fonte: Próprio autor

A *S. maxima* apresentou bom desenvolvimento em todos os pH estabelecidos, não apresentando sensibilidade ao pH inicial do meio de cultivo. O cultivo iniciado em pH mais elevado (pH = 10) atingiu uma ABS levemente mais alta que os demais ensaios. Mesmo começando em pH mais baixo, o cultivo iniciado em pH de 8,55 também atingiu ABS próxima ao cultivo iniciado de pH 10, não sendo conclusivo se o pH mais elevado favorece o crescimento da cianobactéria. Assim, foi descartada a possibilidade de que o pH do meio estivesse influenciando no crescimento da *S. maxima*.

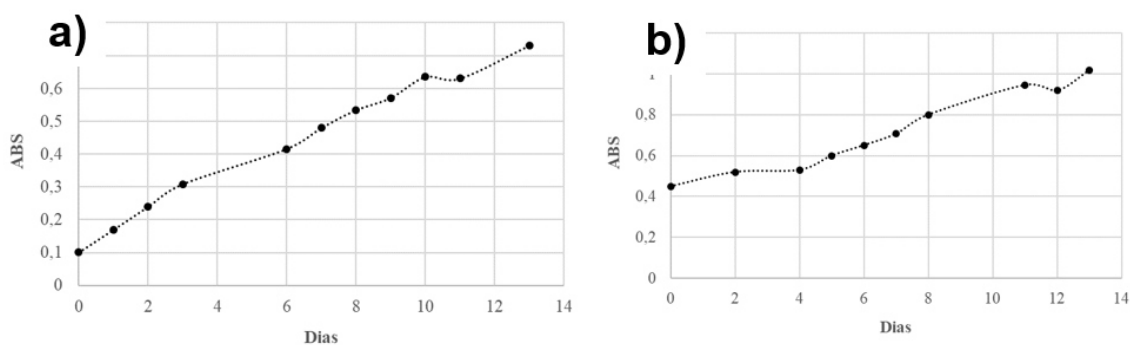
A.2.2.2 Ensaio de concentração inicial de células

Nos ensaios dos cultivos com variação da concentração celular inicial, buscou-se averiguar o comportamento do perfil de crescimento da *S. maxima* em

duas concentrações iniciais de inóculo. As curvas de crescimento obtidas são apresentadas nas Figura 60.

Em ambas concentrações iniciais, é possível observar um crescimento praticamente linear para as duas condições experimentais não tendo-se a definição das fases de crescimento.

Figura 60 - Curva de crescimento de *S. maxima*: a) concentração celular inicial de 0,100 de ABS. b) concentração celular inicial de 0,45 de aABS.



Fonte: Próprio autor

O estado estacionário não foi atingido em nenhum dos ensaios talvez pelo período escolhido, sendo necessário uma avaliação de maior período de cultivo. Ainda assim, é possível inferir que o cultivo tem crescimento significativo mesmo em baixas concentrações e atinge concentração celular, também, significativa sem dificuldade de crescimento, porém, com maior necessidade de maior período de cultivo. Logo, cultivos iniciados com concentração celular de 0,450 de ABS, diminuem o período necessário de cultivo e conseqüentemente altas produtividades.

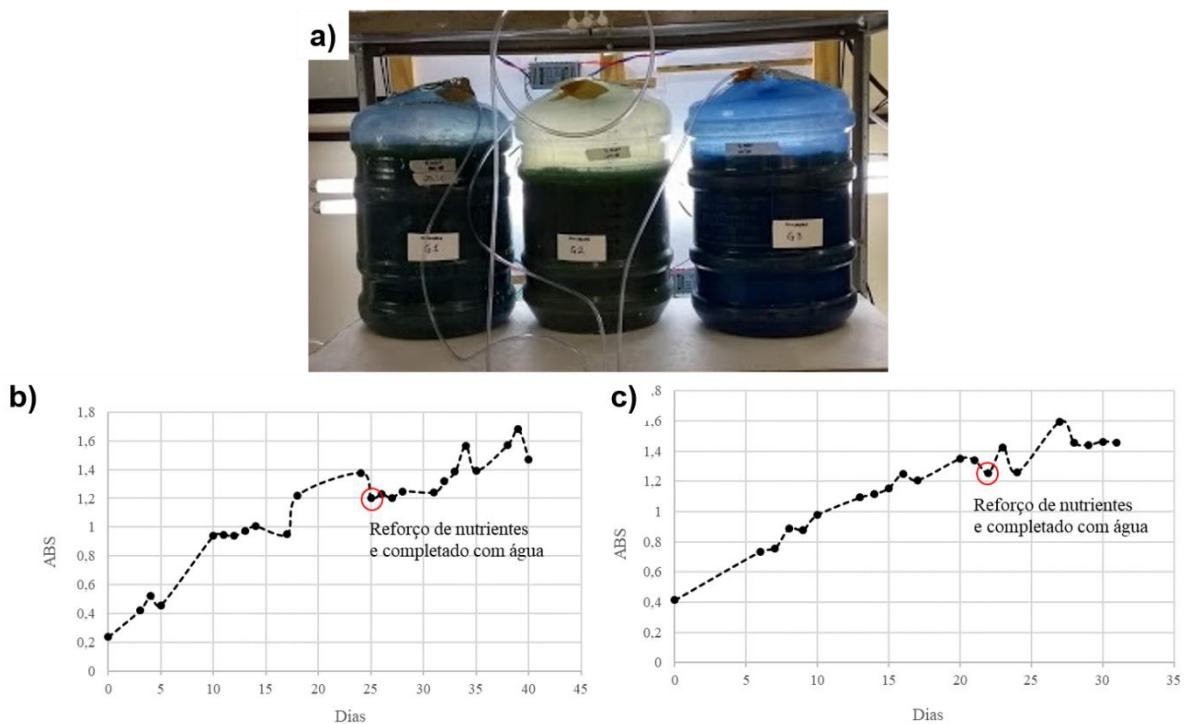
Visto a boa adaptação do cultivo em ambas concentrações iniciais de células, foi realizado um escalonamento para um cultivo de 4 litros em erlenmeyer de 5 litros sob mesmas condições de aeração e iluminação, o qual serviu de inóculo para o biorreator de 16 litros. O biorreator de 16 litros é apresentado na Figura 61 A.

O cultivo no biorreator de 16 litros foi realizado sob as mesmas condições de aeração e iluminação (foi garantido intensidade luminosa de 800 lux na superfície interna do reator). Nesta etapa do trabalho, o período de cultivo foi prolongado até que se estabelecesse um patamar de fase estacionária. A curva de

crescimento aparentou entrar em fase estacionária no 40º dia de cultivo. As curvas de crescimento são apresentadas na Figura 61 B e C.

Em ambos cultivos foram realizados reforço de nutrientes e reposição da água perdida por evaporação natural próximos ao 20º dia de cultivo. Como visto, os cultivos aparentaram entrar em fase estacionária próximo ao 30º dia de cultivo, no entanto, os cultivos não ultrapassaram a leitura de ABS de 1,60.

Figura 61 - a) Fotobiorreatores de 16 litros e curva de crescimento de *S. maxima* no fotobiorreator de 16 litros: b) concentração celular inicial de 0,200 de ABS e c) concentração celular inicial de 0,400 de ABS.



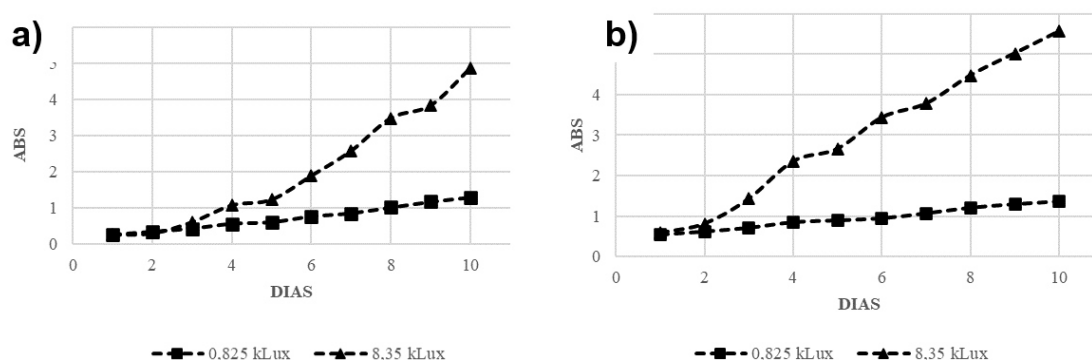
Fonte: Próprio autor

O longo período necessário para atingir a ABS torna inviável a produção de biomassa pela baixa produtividade da espécie no biorreator. A possibilidade mais provável da baixa taxa de crescimento observada é a baixa intensidade luminosa no centro do reator. Conforme o aumento da replicação celular, o sombreamento interno causado pelas próprias células aumenta consideravelmente. Assim, é indicado que os fotobiorreatores para cultivo de *S. maxima* tenham seção transversal menor e de maior incidência de luz sobre o reator para que o efeito do auto-sombreamento não seja intenso.

A.2.2.3 Ensaio de Intensidade luminosa

Com o objetivo de observar fotoinibição pela intensidade luminosa, foram realizados testes com duas intensidades luminosa (0,825 klux e 8,35 klux) com a inoculação de concentrações inicial de células diferentes (0,2 e 0,45 de ABS). As curvas de crescimento obtidas são apresentadas na Figura 62.

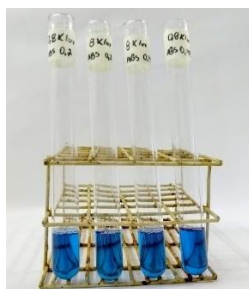
Figura 62 - Curva de crescimento de *S. maxima* em diferentes intensidades luminosa (0,825 klux e 8,35 klux): concentração celular inicial de (a) 0,2 de ABS e (b) 0,4 de ABS.



Fonte: Próprio autor

Embora tivessem concentrações de inoculação diferentes, o comportamento para as duas condições experimentais foi muito parecido. Em ambas concentrações de inoculação houve um perfil de crescimento muito intenso nos cultivos de maior intensidade luminosa. Assim, não foi observado nenhum indício de fotoinibição mesmo em cultivos acima de 8 klux de intensidade luminosa. Os cultivos iniciados com intensidade luminosa mais baixa, praticamente, apresentaram o mesmo perfil de menor taxa de crescimento para ambas concentrações de inóculo. O bom desempenho de crescimento é atribuído ao cultivo ser realizado em erlenmeyers de 500 mL, onde a seção transversal do reator não é suficiente para causar o auto-sombreamento do meio. Isso garantiu a boa incidência de luz sobre o meio de cultivo.

As biomassas deste ensaio foram filtradas, secas em estufa, e determinado o percentual de ficocianina produzida. Assim, foi possível inferir se a variação de luminosidade afetou a produção do pigmento. O sobrenadante contendo a ficocianina das amostras é apresentado na Figura 63.

Figura 63 - Ficocianina extraída nos ensaios de variação de intensidade luminosa.

Fonte: Próprio autor

As amostras foram analisadas em espectrômetro nos comprimentos de onda conforme a metodologia. Os resultados do percentual mássico são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultados obtidos nas extrações de ficocianina nos ensaios de intensidade luminosa.

Concentração celular inicial (ABS)	Ficocianina (% m/m)	
	0,825 klux	8,35 klux
0,2	9,51%	8,57%
0,45	10,64%	9,00%

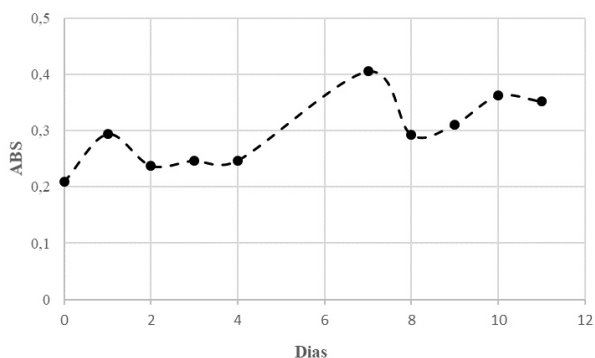
Fonte: Próprio autor

É possível notar que os percentuais em ficocianina são maiores nos cultivos realizados em baixa intensidade luminosa (0,825 klux). Possivelmente, se deve a necessidade de a célula produzir maior quantidade de pigmentos para compensar a menor incidência luminosa e, assim, otimizar a captura de luz pelos pigmentos coletores. Também, nota-se que os cultivos de alta concentração de inóculo apresentaram maior percentual do pigmento, possivelmente devido ao elevado efeito de auto-sombreamento causado pela grande quantidade de células no meio. Assim, o auto-sombreamento também induz uma maior produção da ficocianina como forma de compensar a menor quantidade de luz incidida.

Visto a boa adaptação do cultivo em ambas intensidades luminosa e concentrações de inóculo, foi realizado um novo escalonamento para o fotobiorreator de coluna de bolhas de 18 litros. Este fotobiorreator possui seção transversal menor que os fotobiorreatores de 16 litros utilizados no escalonamento anterior, e permite uma maior incidência de luz sob o cultivo. Inicialmente, cada coluna foi iluminada em ambos os lados com lâmpadas fluorescentes, assim cada lado da coluna de bolhas tinha a incidência de 4,5klux de intensidade luminosa. No

entanto, os cultivos iniciados no fotobiorreator não apresentaram crescimento consistente no cultivo iniciado com ABS de 0,20, como pode ser observado na curva de crescimento apresentada na Figura 64.

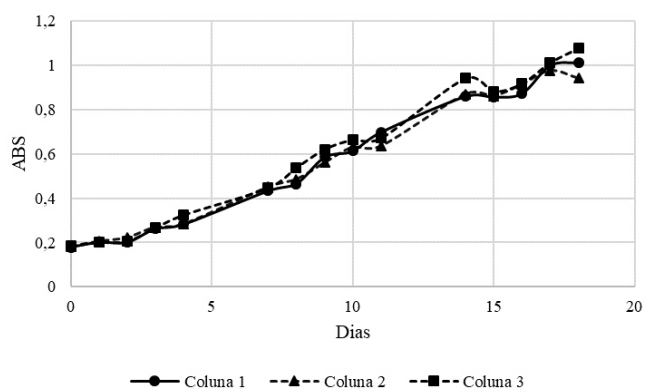
Figura 64 - Curva de crescimento de *S. maxima* em coluna de bolhas (18 litros) com alta incidência luminosa.



Fonte: Próprio autor

O estresse luminoso observado, dada a configuração do fotobiorreator, ocasionou a fotoinibição do cultivo o que acarretou um perfil de crescimento anormal. Diante do ocorrido, resolve-se então desligar uma lâmpada de cada lado da coluna de bolhas e realizar um novo ensaio. Assim, os novos ensaios com cultivos (iniciados em 0,20 de ABS) de menor intensidade luminosa foram realizados nos três fotobiorreatores de colunas (18 litros) e as curvas de crescimento obtidas são apresentadas na Figura 65.

Figura 65 - Curva de crescimento de *S. maxima* em coluna de bolhas com baixa intensidade luminosa.

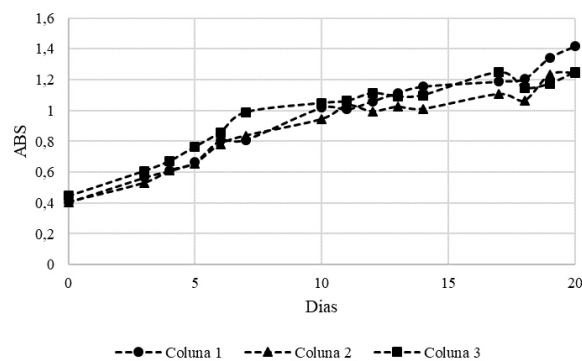


Fonte: Próprio autor

Como visto, sob menor intensidade luminosa no fotobiorreator de coluna, foi possível obter um cultivo com perfil de crescimento bem mais consistente. Sob incidência luminosa menor (4,5 klux de apenas um dos lados da coluna), não foi observado fotoinibição do cultivo. De posse do resultado favorável obtido, foi elaborado uma nova abordagem de cultivo na qual consistiu em aumentar a intensidade luminosa após o cultivo atingir a ABS de 1,0. A curva de crescimento deste novo ensaio (iniciados em 0,40 de ABS) também foi realizada nos três fotobiorreatores de coluna e as curvas de crescimento obtidas são apresentadas na Figura 66.

Iniciando o cultivo com baixa intensidade luminosa, as células não sofreram fotoinibição. Logo, o cultivo pode crescer sem o estresse luminoso e ao atingir uma concentração de células em que o efeito do auto-sombreamento passasse a interferir no crescimento, a incidência de mais luminosidade no fotobiorreator permitiu que as células aumentassem seu crescimento celular ainda mais. E, além disso, obteve-se um aumento na produtividade de biomassa, pois a ABS final foi a maior obtida até este ponto do trabalho.

Figura 66 - Curva de crescimento de *S. maxima* em coluna de bolhas com fase inicial de baixa intensidade luminosa e fase final de alta intensidade luminosa.

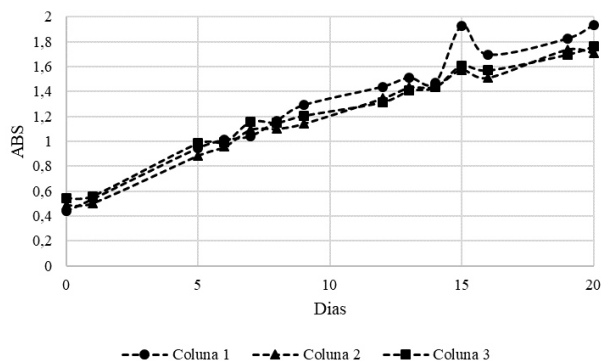


Fonte: Próprio autor

Ainda assim, um último ensaio foi realizado, iniciando o cultivo nas colunas de bolhas utilizando alta incidência luminosa (ambos os lados iluminados) e, diferentemente do primeiro cultivo iniciado com ABS de 0,20, o cultivo foi iniciado em 0,45, supondo-se que esta concentração de células inoculada não iria sofrer fotoinibição. A curva de crescimento deste ensaio também foi realizada nos três

fotobiorreatores de colunas e as curvas de crescimento obtidas são apresentadas na Figura 67.

Figura 67 - Curva de crescimento de *S. maxima* em coluna de bolhas com alta intensidade luminosa iniciados com concentração celular de 0,45 de ABS



Fonte: Próprio autor

Como pode-se observar, o cultivo iniciado com maior concentração celular (ABS de 0,45) não sofreu o efeito da fotoinibição como anteriormente visto nos cultivos iniciados com menor concentração de inóculo (ABS de 0,2). Possivelmente, exista um limiar de concentração celular, entre 0,2 e 0,45, onde o efeito da fotoinibição deixe de existir. Além disso, foi notória o aumento da ABS final, o que garantiu uma maior produtividade de biomassa no mesmo período de cultivo.

Logo, é possível afirmar que o diâmetro do fotobiorreator de coluna de bolhas de 18 litros garante uma boa incidência de luz sob o cultivo, porém, quando somado a baixa quantidade celular do inóculo, o mesmo ocasiona o estresse luminoso nas células de *S. maxima* pela grande intensidade luminosa sob o cultivo. No entanto, o estresse luminoso pode ser facilmente solucionado com a diminuição da luminosidade ou aumento da concentração celular do inóculo. Em específico, para a *S. maxima* foi observado, então, o efeito da fotoinibição do cultivo iniciado em ABS de 0,200 (0,43 g.L⁻¹, em biomassa seca) no fotobiorreator de coluna de bolhas de 18 litros. Porém, com o cultivo iniciado em ABS de 0,450 (0,52 g.L⁻¹), perdeu-se o efeito da fotoinibição, e o mesmo atingiu uma concentração aproximada de 1 g.L⁻¹ no término do cultivo.

Por medidas de garantia e produtividade de biomassa, a produção de biomassa da *S. maxima* passou a ser realizado com concentração celular inicial de 0,450 de ABS. Posteriormente, foram realizados cultivos nos fotobiorreatores de

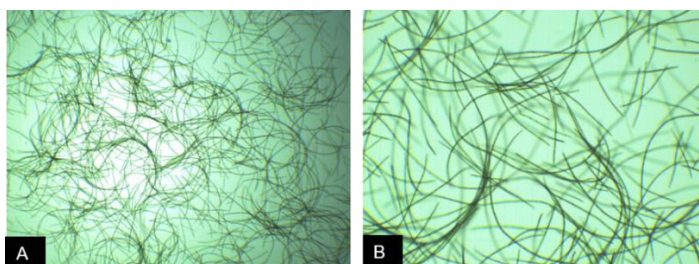
coluna de bolhas de 40 litros os quais tiveram desempenho semelhantes aos dos fotobiorreatores de coluna de bolhas de 18 litros.

A.2.3 Desenvolvimento da *S. maxima* em meio suplementado com acetato de sódio e ureia em reator airlift

A.2.3.1 Análise preliminar da adaptação da *S. maxima* a fontes alternativas de nutrientes

Para efeito de comparação, foi realizado um cultivo de controle juntamente com os cultivos experimentais, o qual seguiu todos os parâmetros de nutrientes do meio Zarrouk. As imagens de microfotografia do cultivo de controle são apresentadas na Figura 68.

Figura 68 - Microfotografia do cultivo de controle (meio Zarrouk): A) zoom de 4 vezes, B) zoom de 10 vezes



Fonte: Próprio autor

Na microfotografia do cultivo de controle (Figura 68) é possível observar a numerosa quantidade de células longas e íntegras, bem como a presença de tricomas jovens e em desenvolvimento, indicando um bom desenvolvimento celular.

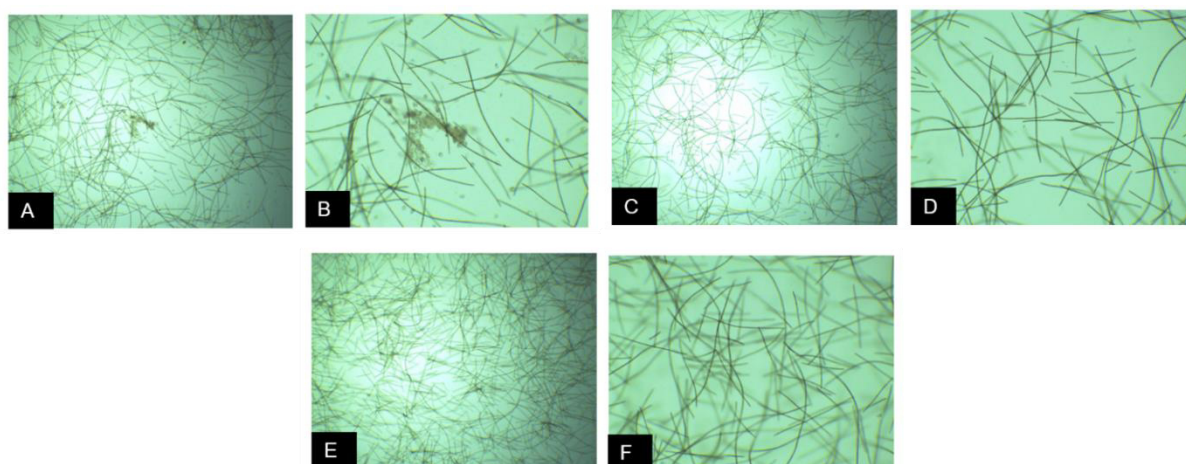
A.2.3.1.1 Acetato de sódio como fonte de carbono

O acetato de sódio foi considerado como uma fonte de carbono em potencial para aumentar o crescimento da *S. maxima*. Nos ensaios preliminares com acetato, foram investigadas o efeito de três concentrações do composto: 17 g.L⁻¹, 4 g.L⁻¹ e 1 g.L⁻¹.

Na Figura 69 são apresentadas a microfotografia dos cultivos realizados com acetato. De maneira geral, a *S. maxima* teve bom desenvolvimento em meio suplementado com acetato de sódio, não apresentando nenhuma dificuldade de crescimento. Nota-se que, em todos os diferentes meios a presença de filamentos longos e de tricomas em desenvolvimentos.

No meio Zarrouk são utilizados 16,8 gramas de bicarbonato de sódio, enquanto no ensaio realizado com acetato, a *S. maxima* se desenvolveu bem com apenas 1 g.L⁻¹ de acetato de sódio.

Figura 69 - Microfotografia dos cultivos realizados com acetato de sódio: 17 g.L⁻¹ (A) zoom4x e (B) zoom10x; 4 g.L⁻¹ (C)zoom4x e (D) zoom (10x); 1 g.L⁻¹ (E) zoom4x e (F) zoom10x.



Fonte: Próprio autor

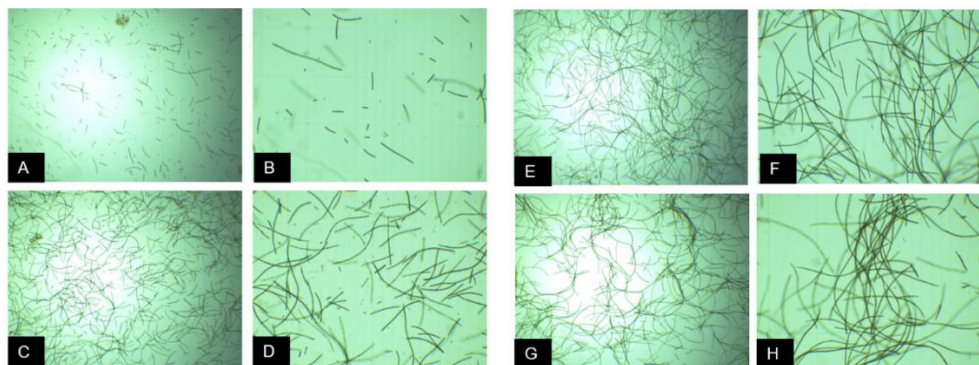
A.2.3.1.2 Ureia como fonte de nitrogênio

Foram realizados ensaios com ureia (fertilizante comercial) como fonte de N visando reduzir o custo do meio de cultura. Nos ensaios dos cultivos com ureia, foram investigados o efeito de quatro concentrações do fertilizante: 3,88 g.L⁻¹, 1,54 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹ 0,35 g.L⁻¹. Na Figura 70 são apresentadas as microfotografias dos cultivos.

A *S. maxima* teve bom desenvolvimento em baixas concentrações de ureia, apresentando dificuldade de crescimento somente em alta carga do composto. Dentre as diferentes concentrações de ureia no meio de cultivo (Figura 70), é possível verificar a presença dos filamentos longos e dos tricomas em desenvolvimentos apenas nos cultivos abaixo de 1,54 g.L⁻¹ (Figura 70 C-H).

Segundo Usharani e colaboradores (2012), a utilização de ureia no meio de cultivo pode ser dificultada devido a hidrólise espontânea desse composto em amônia dada as condições alcalinas do meio Zarrouk. Logo, níveis elevados de ureia ocasiona inibição do crescimento pela toxicidade da amônia.

Figura 70 - Microfotografia dos cultivos realizados com ureia: 3,88 g.L⁻¹ zoom (A) 4x e (B)10x, 1,54 g.L⁻¹ zoom (C) 4x e (D) 10x; 1,0 g.L⁻¹ zoom (E) 4x e (F)10x; 0,35 g.L⁻¹ zoom (G) 4x e H) 10x.



Fonte: Próprio autor

É possível afirmar que o nitrato de sódio utilizado no meio Zarrouk pode ser facilmente substituído pela ureia comercial e utilizada em menor quantidade do nutriente. No meio Zarrouk são utilizados 2,5 gramas de nitrato de sódio, enquanto no ensaio realizado com ureia, a *S. maxima* teve bom desenvolvimento com apenas 0,35 grama da ureia comercial vendida como fertilizante agrícola.

A.2.3.2 Planejamento experimental – *S. maxima* cultivada com meio suplementado com acetato de sódio e ureia.

Os fatores e níveis do planejamento experimental são indicados na Tabela 32. Os experimentos foram realizados em duplicata, empregando as condições experimentais estabelecidas pela metodologia de Taguchi. Foram investigados simultaneamente os efeitos das três variáveis envolvidas no cultivo de *S. maxima* com as fontes de nutrientes alternativas (acetato de sódio e ureia).

Os cultivos do planejamento tiveram sua evolução de densidade celular acompanhado diariamente utilizando medidas de ABS e plotadas as respectivas curvas de crescimento.

Tabela 32 - Fatores e níveis alterados no planejamento experimental L4 de Taguchi para os ensaios de cultivos

Fator Codificado	Fator	Níveis	
		1	2
A	Luminosidade (lux)	1000	4000
B	Concentração de acetato de sódio (g.L ⁻¹)	1	4
C	Concentração de ureia (g.L ⁻¹)	0,35	1

Fonte: Próprio autor

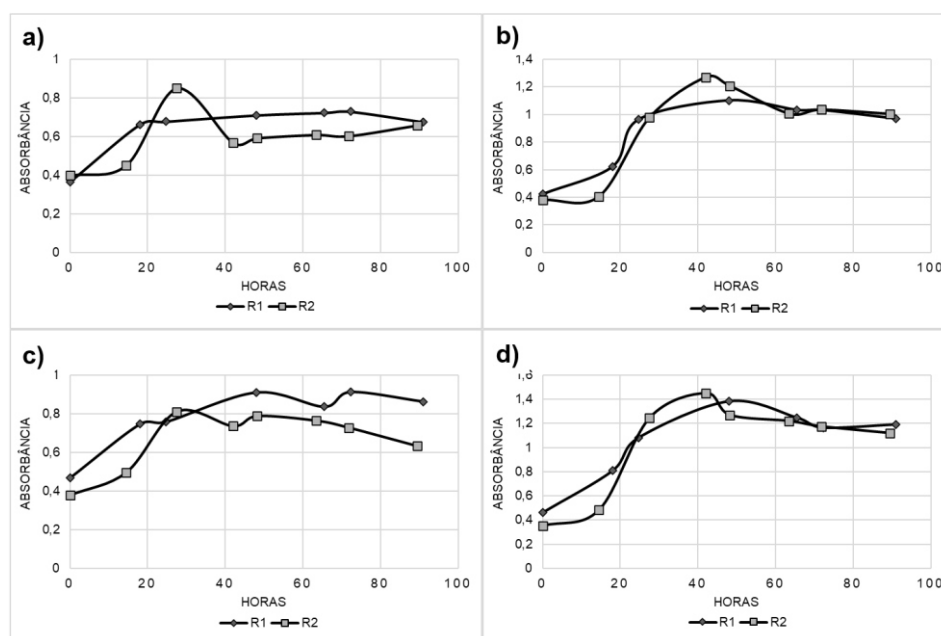
Tabela 33 - Matriz experimental do planejamento L4 de Taguchi com quatro fatores e dois níveis.

Experimento	Fatores		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Fonte: Próprio autor

O encerramento da batelada dos cultivos foi determinado pela ocorrência da fase estacionária do cultivo, que ocorreram em cerca de 90 h de batelada e, assim, padronizados para todos os cultivos experimentais. As curvas de crescimento das cianobactérias são apresentadas na Figura 71

Figura 71 - Curva de crescimento de *S. máxima* em reator airlift em meio suplementado com acetato de sódio e ureia: a) exp. 1, b) exp. 2, c) exp. 3 e d) exp. 4



R1 - Réplica 1; R2 - Réplica 2.

Fonte: Próprio autor

As diferenças observadas entre as curvas dos cultivos permitem reconhecer que os parâmetros manipulados no planejamento experimental afetaram de maneira diferentes os perfis de crescimento da cianobactéria. No entanto, em todas as condições experimentais é possível observar a inexistência da fase lag (fase de adaptação) nas bateladas. Este fato indica a fácil assimilação das fontes de nutrientes pelas células de *S. maxima*, dada ao rápido crescimento nas primeiras 20 h de crescimento onde praticamente o valor de ABS teve seu valor duplicado em relação a hora zero.

Nota-se que os experimentos 2 e 4 apresentaram o maior crescimento celular com ABS entre 1,2 e 1,4, enquanto os experimentos 1 e 3 tiveram crescimento menor com ABS entre 0,7 e 0,9. Na condição experimental 1 (Figura 71 A), realizada com 1000 lux, acetato de sódio a 1 g.L^{-1} e ureia a $0,35 \text{ g.L}^{-1}$, foi o perfil de menor taxa de crescimento devido à menor incidência luminosa e menor quantidade de nutrientes disponíveis que foram rapidamente consumidos pelas células. Na condição experimental 2 (Figura 71 B), realizada com 1000 lux, acetato de sódio a 4 g.L^{-1} e ureia a 1 g.L^{-1} , apresentou um aumento considerável da taxa de crescimento devido ao aumento da disponibilidade dos dois nutrientes. No entanto, na condição experimental 3 (Figura 71 C), realizada com 4000 lux, acetato de sódio a 1 g.L^{-1} e ureia a 1 g.L^{-1} , novamente, a uma taxa de crescimento foi menor mesmo com o aumento da intensidade luminosa. Era esperado um crescimento maior, ou equivalente ao experimento 2, com a maior incidência luminosa no reator. Porém, a menor taxa encontrada é explicada pela diminuição na quantidade de acetato de sódio, indicando que este nutriente é o parâmetro de maior efeito no crescimento celular. Por fim, na condição experimental 4 (Figura 71 D), realizada com 4000 lux, acetato de sódio a 4 g.L^{-1} e ureia a $0,35 \text{ g.L}^{-1}$, fora a condição de maior taxa de crescimento obtida até então. Neste caso, houve a maior incidência luminosa e maior quantidade disponível de acetato de sódio, o qual mostrou-se de maior efeito no cultivo. Além disso, a redução da quantidade de ureia também causou a melhora da taxa de crescimento, possivelmente pela menor liberação de amônia no meio. Estas observações são confirmadas na análise estatística ANOVA.

A.2.3.3 Análise estatística e efeitos dos fatores – *S. maxima* em meio suplementado em acetato de sódio e ureia

Os resultados obtidos com base na matriz de L4 de Taguchi são apresentados na Tabela 34. Os resultados apresentam as respostas referentes a cada condição experimental ao final da batelada de 9 dias.

Tabela 34 - Matriz experimental e resultados obtidos dos cultivos de *S. maxima* com meio Zarrouk modificado com acetato e ureia.

Experimento	Fator			Rendimento em massa seca (g.L ⁻¹)	Carboidratos (% m/m)	Ficocianina (% m/m)	BC (% m/m)
	A	B	C				
1	1	1	1	0,589	7,09	5,68	49,72
2	1	2	2	0,695d	9,08	8,01	42,88
3	2	1	2	0,616	6,87	2,15	51,02
4	2	2	1	0,751	13,01	7,71	47,87

Fatores: A – Concentração de Chorume (% v/v); B – Fonte luminosa; C – Luminosidade.

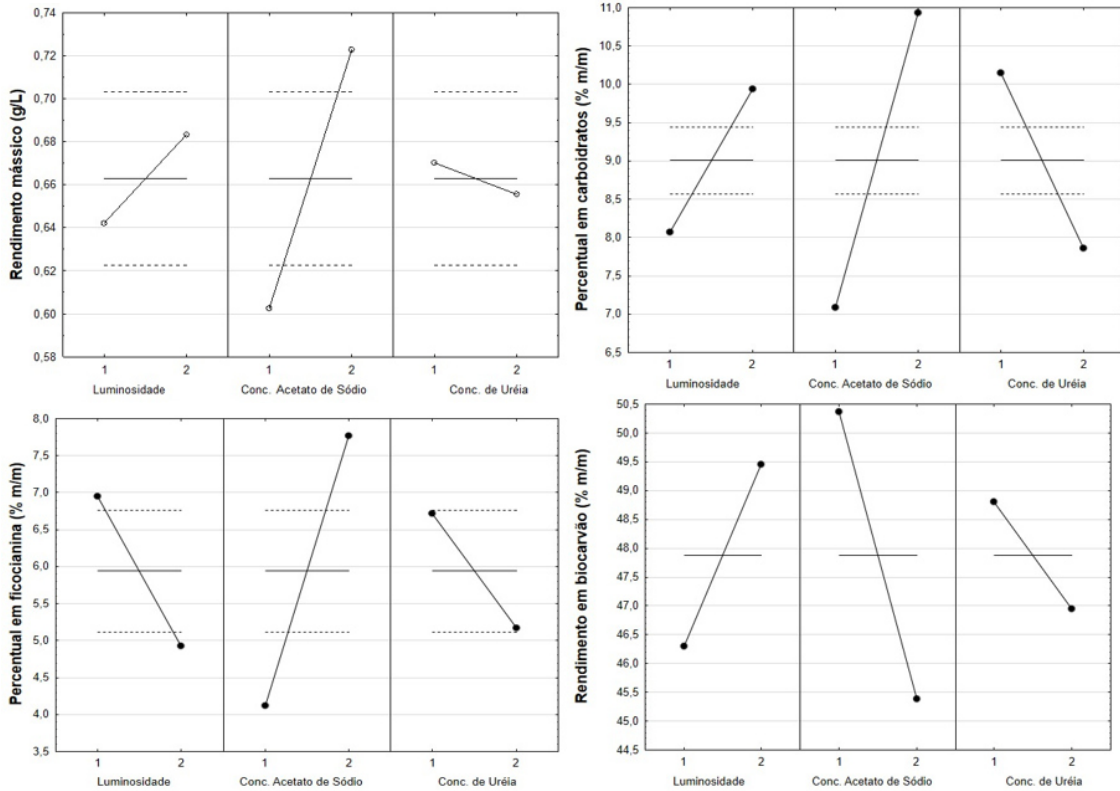
Fonte: Próprio autor

Todos os gráficos de efeitos das variáveis manipuladas, e a tabela ANOVA foram gerados pelo software Statistica 10. O gráfico de efeitos e ANOVA para médias das variáveis respostas são apresentados na Figura 72 e Tabela 35

Segundo o gráfico de efeitos (Figura 72), o ajuste que sugere a maximização da variável resposta de rendimento em massa seca (g.L⁻¹) segue a seguinte combinação de fatores: luminosidade em nível alto (4000 lux), concentração de aceto de sódio em nível alto (4 g.L⁻¹) e indiferente a concentração de ureia podendo-se empregar o nível baixo (1 g.L⁻¹) a fim de diminuir custos. Assim a indicação dos ajustes para a maximização do rendimento mássico a condição experimental número 4 da matriz L4 de Taguchi.

O ajuste que sugere a maximização da variável resposta de percentual de carboidratos (% m/m) segue a seguinte combinação de fatores: luminosidade em nível alto (4000 lux), concentração de aceto de sódio em nível alto (4 g.L⁻¹) e concentração de ureia em nível baixo (0,35 g.L⁻¹). Essa condição experimental corresponde ao experimento 4 da matriz L4 de Taguchi.

Figura 72 - Gráfico de efeitos da metodologia de Taguchi para as médias das variáveis respostas.



Fonte: Próprio autor

Tabela 35 - ANOVA para as médias das variáveis resposta

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
Variável resposta: Rendimento mássico					
A	0,0034	1	0,0034	4,175	0,111
B	0,0289	1	0,0289	35,479	0,004
C	0,0004	1	0,0004	0,534	0,506
Residual	0,0033	4	0,0008		
Variável resposta: Carboidratos					
A	10,4907	1	10,4907	110,7101	5,799E-06
B	44,4675	1	44,4675	469,2727	2,173E-08
C	15,7323	1	15,7323	166,0255	1,244E-06
Residual	0,7580667	8	0,0947583		
Variável resposta: Ficocianina					
A	8,181012	1	8,181012	24,15326	0,007960157
B	26,68151	1	26,68151	78,77333	0,000890233
C	4,789513	1	4,789513	14,14035	0,01976863
Residual	1,35485	4	0,3387125		
Variável resposta: BC					
A	19,845	1	19,845	2,178961	0,2139509
B	49,8002	1	49,8002	5,468013	0,07951932
C	6,845	1	6,845	0,7515742	0,4348878
Residual	36,4302	4	9,10755		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

Fonte: Próprio autor

Para o percentual de ficocianina (% m/m), o ajuste que sugere a maximização segue a seguinte combinação de fatores: luminosidade em nível baixo (1000 lux), concentração de acetato de sódio em nível alto (4 g.L⁻¹) e concentração de ureia em nível baixo (0,35 g.L⁻¹). Esse ajuste de fatores não se encontra na matriz L4 de Taguchi, necessitando um ensaio confirmatório.

A nova batelada do ensaio confirmatório foi realizada em triplicata nos reatores airlift e com as mesmas 90 h de cultivo, seguindo a combinação de fatores conforme sugerido pelo gráfico de efeitos da metodologia de Taguchi. Após colheita e secagem da biomassa foi realizado uma nova extração da ficocianina. Após a leitura da ABS e estipulação da concentração do pigmento no sobrenadante, o ajuste sugerido pelo gráfico de efeitos resultou em uma média de 8,38% +- 0,921% (% m/m) de ficocianina nas células de *S. máxima*, valor que superou o maior percentual obtido na matriz experimental (experimento 2). Assim, confirmando o melhor ajuste para o aumento da concentração de ficocianina no interior da célula: 1000 lux de luminosidade, 4 gramas de aceto de sódio e 0,35 grama de ureia para cada litro de cultivo.

A.2.4 Desenvolvimento da *S. máxima* em meio suplementado com chorume

Os fatores e níveis do planejamento experimental do cultivo suplementado com chorume são apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 - Matriz experimental e resultados obtidos dos cultivos de *S. máxima* com meio Zarrouk modificado com chorume

Fator Codificado	Fator	Níveis	
		1	2
A	Concentração de chorume (% v/v)	5	10
B	Fonte luminosa (lâmpada)	Fluorescente	Tubular LED
C	Luminosidade (lux)	1000	4000

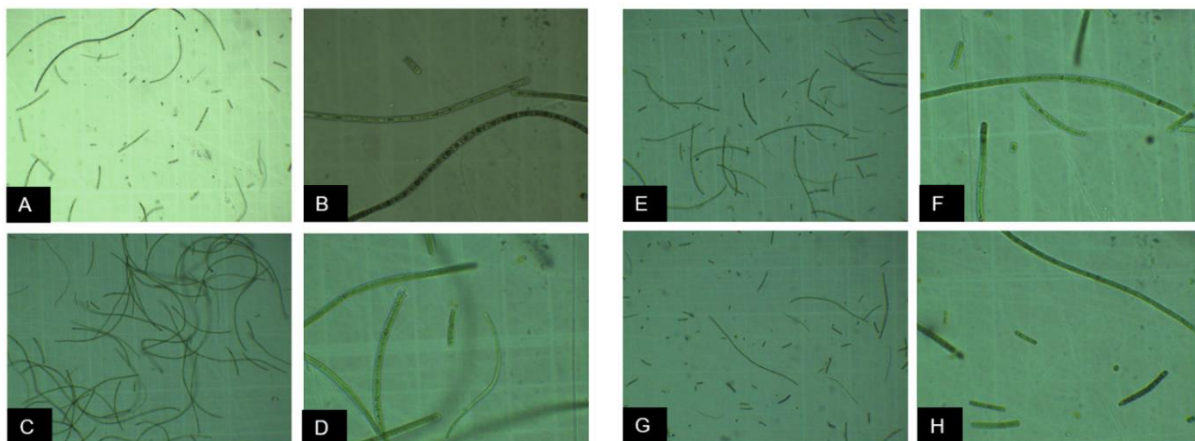
Fonte: Próprio autor

Os experimentos foram realizados em duplicata, empregando as condições experimentais estabelecidas pela metodologia de Taguchi. Na Figura 73 são apresentados a microfotografia (microscópio trinocular acoplado com câmera digital) dos cultivos experimentais realizados com chorume.

Nota-se que a *S. maxima* teve menor desenvolvimento nos experimentos 1, 3 e 4. Nos tres experimentos é possível observar a baixa quantidades de células, apresentando baixa quantidade de filamentos longos e, em sua grande maioria apresentando apenas alguns tricomas que não se desenvolveram.

No entanto, especificamente, a microfotografia do experimento 2 apresentou a maior quantidade de células indicando um melhor desenvolvimento quando comparado às demais microfotografias. Assim, é possível afirmar que os macronutrientes pode ser facilmente substituído por chorume em dadas condições que favoreçam a assimilação do lixiviado.

Figura 73 - Microfotografia dos cultivos realizados com chorume: Exp. 1 (A) zoom 4x e (B) zoom 40x; Exp. 2 (C) zoom 4x e (D) zoom 40x, Exp. 3 (E) zoom 4x (F) zoom 40x; Exp. 4 (G) zoom 4x e (H) zoom 40x.

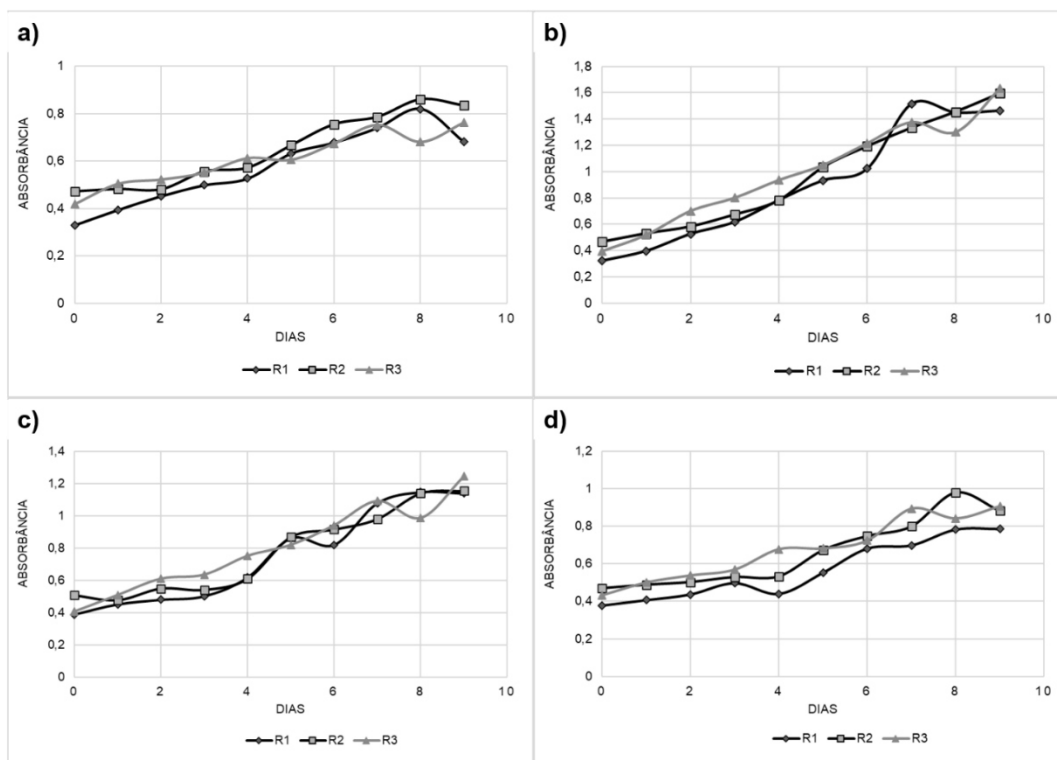


Fonte: Próprio autor

As curvas de crescimento da *S. maxima* são apresentadas na Figura 74. Foi observado um perfil de crescimento linear em todos os experimentos, sem identificação de fase lag ou fase exponencial de crescimento na batelada. Foi identificável apenas a fase estacionária a partir do 8º dia de cultivo. A inexistência de uma fase exponencial indica que a assimilação do chorume pode ser dificultosa na metabolização pelas células. Nota-se que os experimentos 2 e 3 apresentaram o maior desenvolvimento celular com ABS médias de 1,56 e 1,18, respectivamente. Em ambos os experimentos a intensidade luminosa foi de 4000 lux indicando que a luminosidade atua como um facilitador na metabolização do chorume pelas células. Porém, a porcentagem de chorume nestes experimentos foi diferente, exp.

2 com 5% (v/v) e exp. 3 com 10% (v/v), indicando que o aumento na carga de chorume afetou negativamente a assimilação do composto.

Figura 74 - Curvas de crescimento de *S. maxima* em meio suplementado com chorume: a) exp. 1, b) exp. 2, c) exp. 3 e d) exp. 4



R1- Réplica 1; R2 - Réplica 2; R3 - Réplica 3.

Fonte: Próprio autor

A.2.4.1 Análise estatística e efeitos dos fatores – *S maxima* em meio suplementado em chorume

Os resultados obtidos com base na matriz de L4 de Taguchi são apresentados na Tabela 37. Os resultados apresentam as respostas referentes a cada condição experimental ao final da batelada de 9 dias. O gráfico de efeitos e análise variância para médias das variáveis respostas são apresentados na Figura 75 e Tabela 38.

Segundo o gráfico de efeitos (Figura 75), o ajuste que sugere a maximização da variável resposta de rendimento em massa seca (g.L^{-1}) segue a seguinte combinação de fatores: concentração de chorume em nível baixo (5%v/v), fonte luminosa em nível alto (lâmpada tubular de LED) e luminosidade em nível alto

(4000 lux). Assim a indicação dos ajustes para a maximização do rendimento mássica é referente a condição experimental número 2 da matriz L4 de Taguchi.

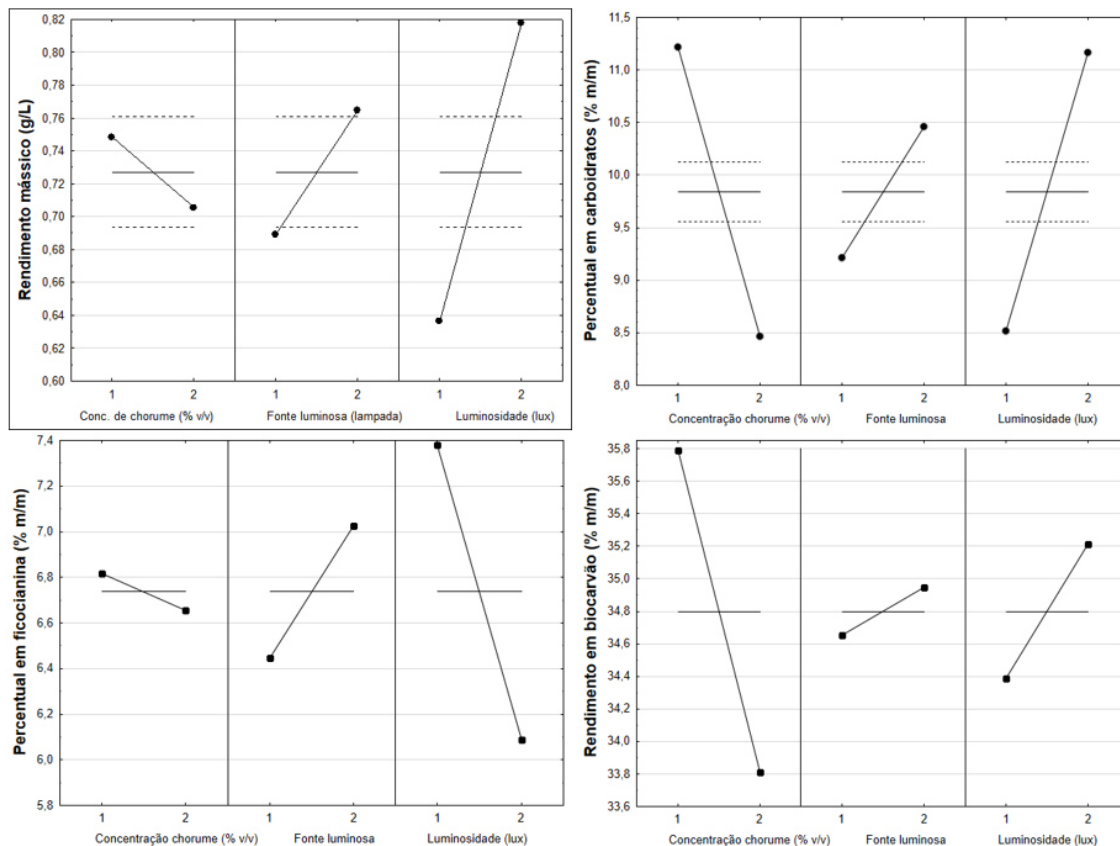
Tabela 37 - Matriz experimental e resultados obtidos dos cultivos de *S. maxima* com meio Zarrouk modificado com Chorume.

Experimento	Fator			Rendimento em massa seca (g.L ⁻¹)	Carboidratos (% m/m)	Ficocianina (% m/m)	BC (% m/m)
	A	B	C				
1	1	1	1	0,62	9,16	7,17	35,23
2	1	2	2	0,885	13,1	6,45	36,34
3	2	1	2	0,758	9,16	5,72	34,07
4	2	2	1	0,652	7,76	7,58	33,54

Fatores: A – Concentração de Chorume (% v/v); B – Fonte luminosa; C – Luminosidade.

Fonte: Próprio autor

Figura 75 - Gráfico de efeitos da metodologia de Taguchi para as médias das variáveis respostas.



Fonte: Próprio autor

O ajuste que sugere a maximização da variável resposta do percentual de carboidratos (% m/m) segue a seguinte combinação de fatores: concentração de chorume em nível baixo (5% v/v), fonte luminosa em nível alto (lâmpada tubular de

LED) e luminosidade em nível alto (4000 lux). Essa condição experimental corresponde ao experimento número 2 da matriz L4 de Taguchi.

Tabela 38 - ANOVA para as médias das variáveis resposta.

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
Variável resposta: Rendimento mássico					
A	0,0055	1	0,0055	9,6832	0,0144
B	0,0171	1	0,0171	30,0849	0,0006
C	0,0988	1	0,0988	173,8632	0
Residual	0,004547	8	0,000568		
Variável resposta: Carboidratos					
A	22,6875	1	22,6875	565,1858	0
B	4,662533	1	4,662533	116,152	0,000005
C	20,96163	1	20,96163	522,1914	0
Residual	0,321133	8	0,040142		
Variável resposta: Ficocianina					
A	0,052813	1	0,052813	0,056096	0,824411
B	0,667013	1	0,667013	0,708486	0,447327
C	3,341113	1	3,341113	3,548854	0,132691
Residual	3,76585	4	0,941463		
Variável resposta: BC					
A	7,8408	1	7,8408	0,914526	0,393071
B	0,17405	1	0,17405	0,020301	0,893589
C	1,36125	1	1,36125	0,158772	0,710644
Residual	34,2945	4	8,573625		

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; SMQ - Soma Média Quadrática; F – Teste F; P – Valor-p.

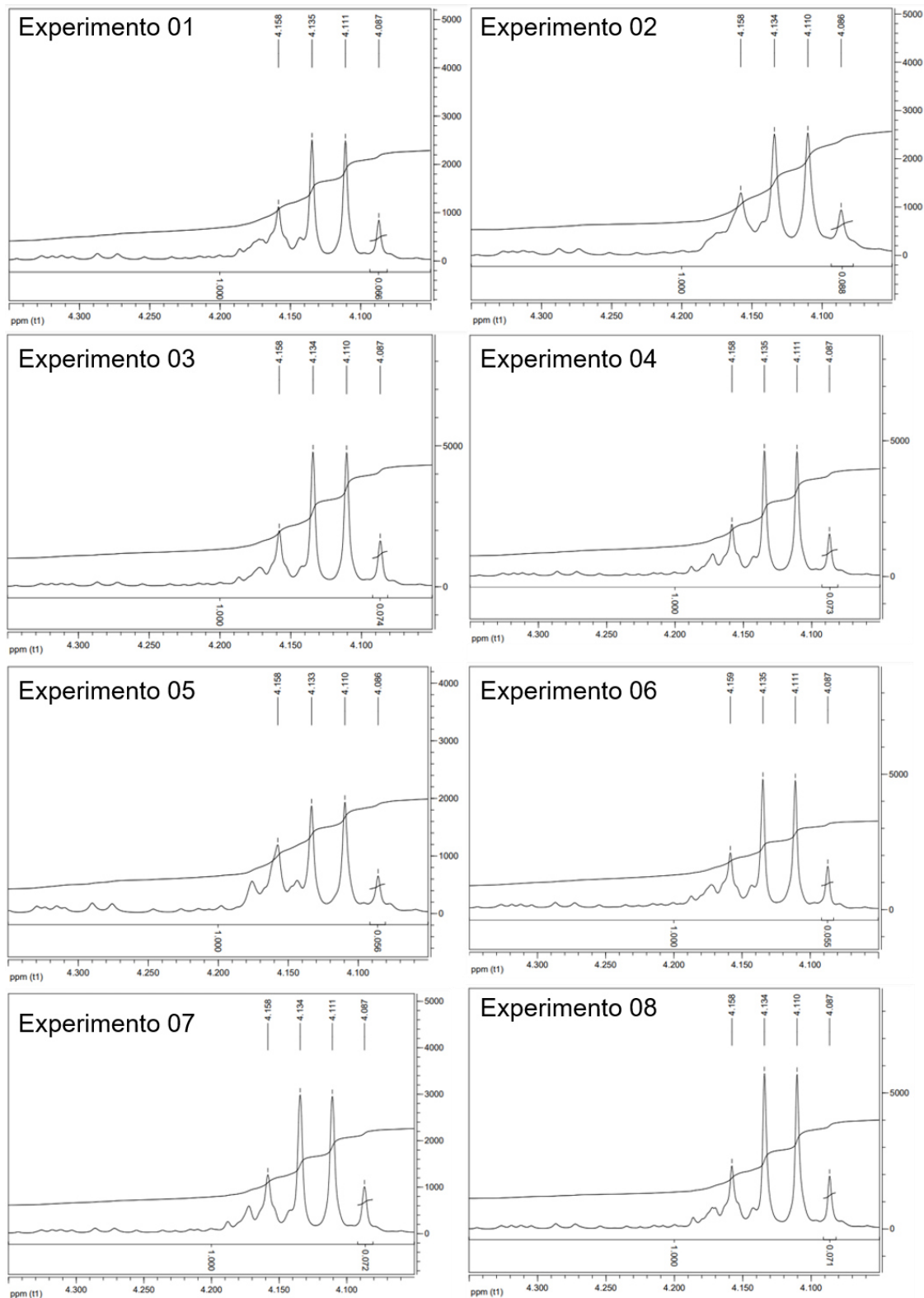
Fonte: Próprio autor

Para o percentual de ficocianina (% m/m), o ajuste que sugere a maximização segue a seguinte combinação de fatores: indiferente para a concentração de chorume - aconselha-se o nível alto de concentração de chorume (10% v/v) a fim de consumir em maior quantidade o lixiviado -, fonte luminosa em nível alto (lâmpada tubular de LED) e luminosidade em nível baixo (1000 lux). Corresponde ao experimento número 4 da matriz L4 de Taguchi.

Por fim, o ajuste que sugere a maximização da variável resposta de percentual em BC (% m/m) segue a combinação de fatores: concentração de chorume em nível baixo (5% v/v) e indiferentes para fonte luminosa e luminosidade.

APÊNDICE B – Espectros de RMN¹H do processo de TE heterogênea do óleo de macaúba utilizando o catalisador de BC.

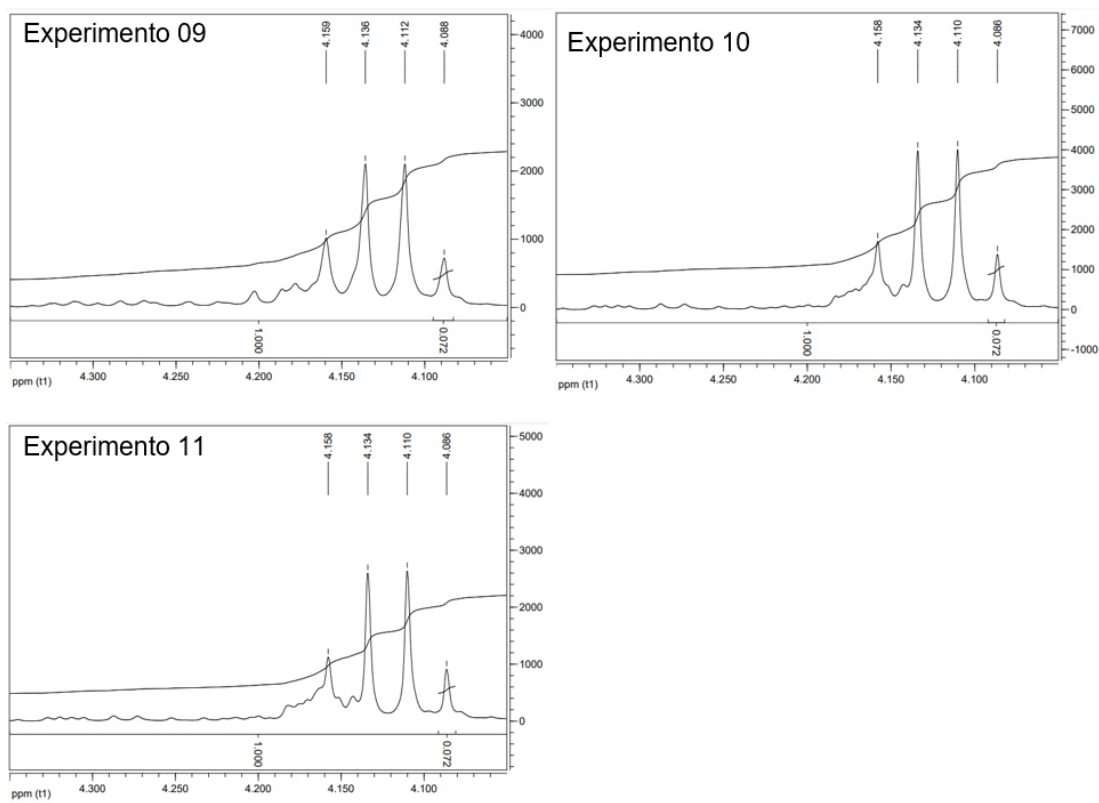
Figura 76 - Espectros de RMN¹H -TE heterogênea do óleo de macaúba.



(continua)

(continuação)

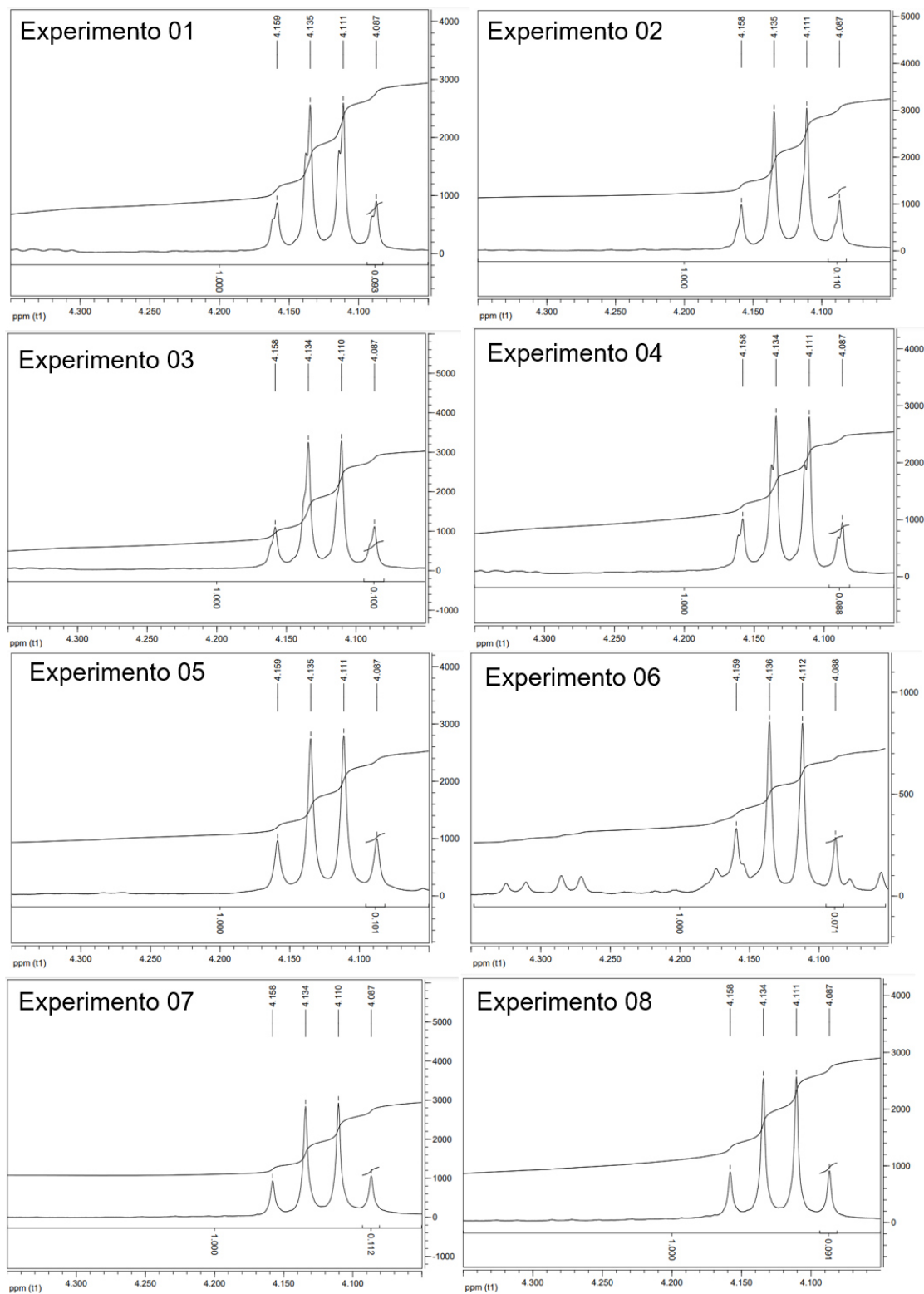
Figura 76 - Espectros de RMN¹H -TE heterogênea do óleo de macaúba.



Fonte: Próprio autor

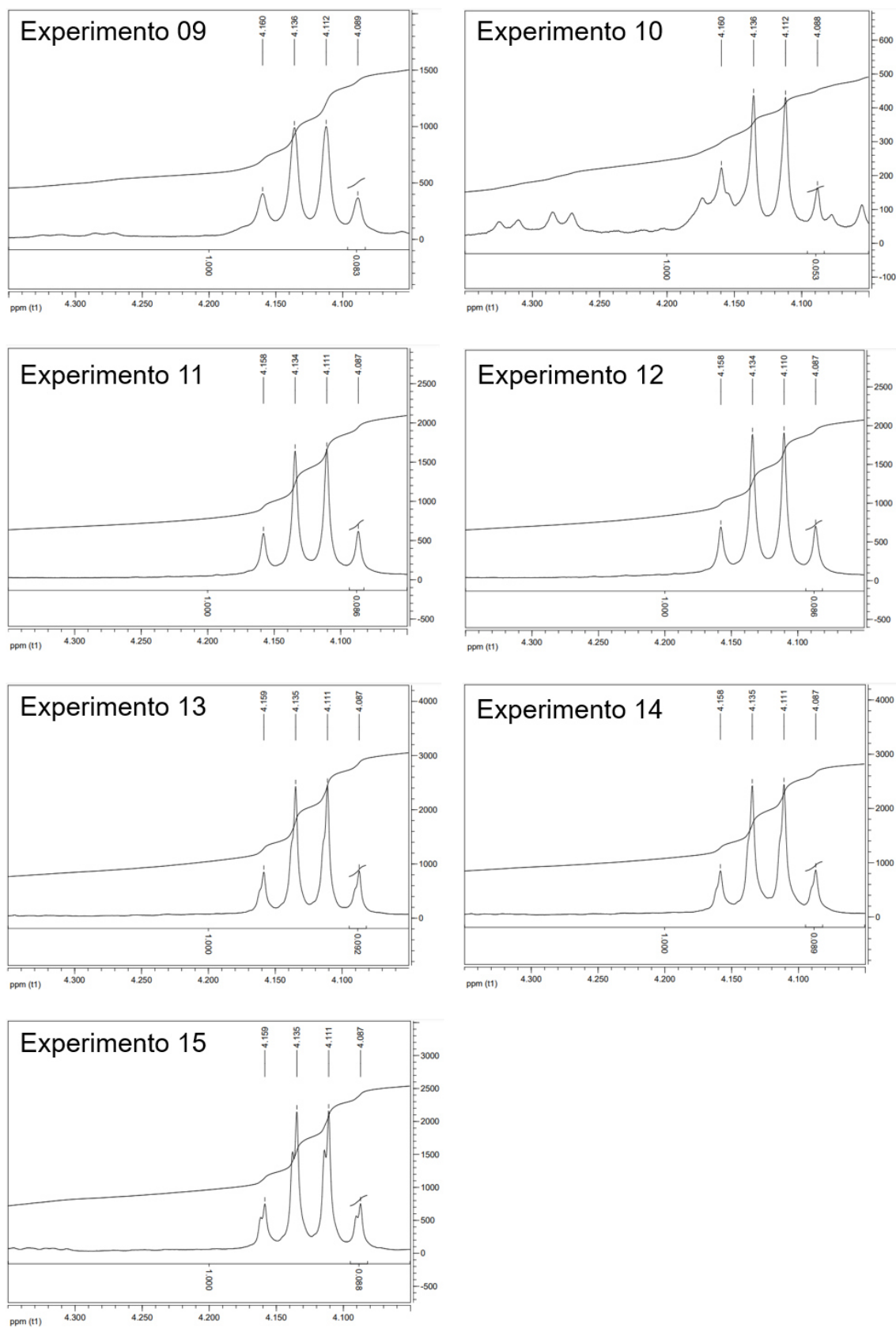
APÊNDICE C – Espectros de RMN¹H do processo de TEIS heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii* utilizando o catalisador de BC.

Figura 77 - Espectros de RMN¹H - TEIS heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*.



(continua)

(continuação)

Figura 77 – Espectros de RMN¹H - TEIS heterogênea da biomassa úmida de *B. braunii*.

Fonte: Próprio autor