



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

LARISSA RIBEIRO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE METANO
A PARTIR DE BIOMASSA ALGAL**

RECIFE

2019

LARISSA RIBEIRO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE METANO
A PARTIR DE BIOMASSA ALGAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil.

Área de Concentração: Tecnologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

M386a Martins, Larissa Ribeiro.
 Avaliação de pré-tratamentos para a produção de metano a partir de biomassa
 algal / Larissa Ribeiro Martins. - 2019.
 93 folhas, il., tab., abr. e sigl.

 Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de
 Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2019.
 Inclui Referências.

 1. Engenharia Civil. 2. Digestão de biomassa algal. 3. Pré-tratamentos.
 4. Hidrotérmico. 5. Produção de celulase. 6. Esgoto doméstico. I. Santos, Maria de
 Lourdes Florencio dos (Orientadora). II. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2019-267



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

A comissão examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE METANO
A PARTIR DE BIOMASSA ALGAL**

defendida por

Larissa Ribeiro Martins

Considera a candidata APROVADA

Recife, 18 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos
(orientadora)

Prof.^a Dr.^a Marília Cavalcanti de Holanda Maciel – UFPE
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Amaral Pastich Gonçalves – UFPE
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Simone Machado Santos – UFPE
(examinadora externa)

Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite – UFPE
(examinador interno)

Dedico este trabalho ao meu pai, Everaldo
(*in memoriam*) e as minhas sobrinhas,
Thayllane e Sophia.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

À FACEPE, FINEP, CNPq, INCT ETEs Sustentáveis Sustainable e Fibra Técnica Ltda pelo apoio ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da UFPE.

À Deus, pela fé que me proporciona, por sempre atender as minhas súplicas.

Agradeço a minha mãe Maria do Socorro Ribeiro Martins, pela paciência e compreensão, sempre me dando a força necessária para que eu persistisse até o fim. Obrigada pelo auxílio nas diferentes formas de dificuldades. À minhas irmãs, Cíntia Ribeiro Martins e Sinara Ribeiro Martins, pelo apoio, pelas palavras de incentivo e paciência. Às minhas sobrinhas, Thayllane Ribeiro e Sophia Ribeiro por me proporcionarem tantos momentos felizes em dias de angústia. Ao meu noivo Diogo Oliveira pela paciência, apoio e compreensão. Às minhas tias Carmem de Lourdes, Josenai Vasconcelos e Glicéria Maria, pelas orações e palavras de incentivo.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Lourdinha Florencio pela oportunidade, pela orientação, pela paciência, pela confiança depositada e por ser fonte de inspiração. Ao professor Dr. Mário Kato, pela oportunidade, pelos ensinamentos e o exemplo de disciplina. À Prof.^a Dr.^a Sávila Gavazza pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e palavras de apoio. Ao prof. Dr. Wanderli Leite por ter sido um grande incentivador, pela ajuda e contribuição no desenvolvimento desse trabalho. À Prof.^a Dr.^a Elizabeth Pastich, pelas palavras de apoio, por ter sido através de uma oportunidade concedida por ela, ainda na iniciação científica, que hoje finalizo mais um ciclo.

À Prof.^a Dr.^a Marília Maciel, aos colegas Devson Paulo e Glêydison Amarante (minha equipe sobre fungos) pelo apoio e pela contribuição tão importante no desenvolvimento desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica (ICs) Isabela Marques, Kamila Cardoso, Johnies Jaaziel, em especial à Amanda Santos e Paulo Silva. Sem a contribuição de vocês tudo seria ainda mais difícil. Obrigada pelas diversas formas de ajuda em todos os momentos.

À técnica Danúbia Freitas, minha grande amiga, pela ajuda não somente com as análises, mas pela ajuda de vida, pelas orações, por ter se tornado um porto seguro. Ao técnico Ronaldo Fonseca por todo apoio, por ser um grande amigo, por fazer tudo parecer mais leve. Ao técnico Iago José pelas conversas e ajuda no laboratório.

À Andrea Negromonte, Claudiane Ferreira e Cleide, secretárias da Pós-graduação de Engenharia Civil da UFPE, pela atenção e presteza no atendimento.

À Tamillys Lima e Marinalva Simões pela atenção e amizade.

Aos amigos do LSA, Edécio Souza, Robson José, Marcus Vinícius, Luiz Galdino, Sílvia Mariana, Marcella Paiva, Sandra Meirelles, Shyrlane Veras. Em especial, ao grupo “os esgotados”, que foram minha família nesses anos longe de casa. Que aliviaram a rotina exaustiva, sendo meu suporte quando tudo parecia dar errado e meu maiores incentivadores a não desistir e tentar de novo, sempre. Cada um com suas particularidades foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Agradeço a Mariana Nanes, Denise Marcelino, Osmar Menezes, Bárbara Moraes, Oucilane Ingret, Sofia Pimentel, Poliana Januário, Rhayssa Silva, Marcelo Guerra e Carlos Pereira pelo apoio emocional, trabalhos em equipe, revisões de textos, entre outros.

À Norma Amorim pela ajuda com a cinética. À Jucélia Tavares pelo apoio em momentos bem difíceis, pela amizade e pelas orações. À Antônio Gustavo por estar comigo no LSA em qualquer momento, dia ou hora, não me deixando desistir, tentando sempre fazer com que tudo fosse mais leve. À Juliana Melo, por ser um porto seguro em qualquer situação e não me desamparar num momento bem complicado da reta final.

À Gelsomina Mascarenhas, Janaína Peres, Kahena Vasconcelos, Priscila Mendes e Samantha Portugal, Arianne Marques pelo carinho e palavras de apoio e motivação.

À Nathaly Cordeiro, minha irmã de coração, que além de está comigo no LSA em dias e horários improváveis, me deu abrigo de várias formas e foi minha maior incentivadora. Obrigada por está comigo até o último segundo desse trabalho. Minha eterna gratidão!

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A digestão anaeróbia de microalgas (DA) é considerada uma alternativa promissora para recuperação de energia, através da produção de metano (CH₄). No entanto, muitas vezes é necessária a aplicação de pré-tratamentos para promover a quebra da parede celular desses micro-organismos e aumentar a sua biodegradabilidade. Neste sentido, o presente trabalho avaliou diferentes pré-tratamentos para a produção de CH₄, utilizando biomassa algal. Para isso foram realizados três experimentos. No primeiro, foi avaliada a extração lipídica, como pré-tratamento, de *Chlorella vulgaris* (C) e *Desmodesmus subspicatus* (D), utilizando dois tipos de misturas de solventes: clorofórmio-metanol (CM) e etanol-hexano (EH). Como principal resultado, a mistura etanol-hexano destacou-se como a melhor alternativa para a produção simultânea de lipídios e CH₄. A composição bioquímica das espécies e a provável inibição pelo uso do CM influenciaram no processo de DA. No segundo experimento, foi avaliado o efeito de pré-tratamentos (ultrassom, micro-ondas e hidrotérmico) na solubilização da biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos e a presença de nutrientes na DA. A solubilização (17%) foi obtida com o pré-tratamento hidrotérmico e as produções de CH₄ para as biomassas *in natura* e pré-tratadas, com e sem nutrientes, não apresentaram diferença significativa, com exceção entre a biomassa *in natura* (190 ± 5,7 mL CH₄/g DQO) e pré-tratada com nutrientes (160 ± 11,3 mL CH₄/g DQO). No terceiro experimento, foi avaliado o pré-tratamento biológico de *Chlorella* sp. através da atividade de enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) produzidas por *Aspergillus niger* (URM 4645) e *Trichoderma aureoviride* (URM 4645). *A. niger* apresentou maiores atividades celulolíticas (FPase: 0,103 ± 0,012 U/mL e CMCase: 0,873 ± 0,015 U/mL). Os resultados indicaram a viabilidade do uso de efluente doméstico como meio de cultura para fermentação submersa, no entanto, o tratamento biológico não favoreceu a produção de CH₄. Em geral, apenas a extração lipídica apresentou efeitos positivos sobre o grau de solubilização das biomassas e, consequentemente, sobre os rendimentos de CH₄.

Palavras-chave: Digestão de biomassa algal. Pré-tratamentos. Hidrotérmico. Produção de celulase. Esgoto doméstico.

ABSTRACT

Anaerobic digestion of microalgae (AD) is considered a promising alternative for energy recovery through the production of methane (CH₄). However, pre-treatments are required to promote microorganisms cellular wall breakdown in order to increase their biodegradability. In this sense, the present work assessed different pre-treatments for CH₄ production using algal biomass. Three experiments were performed. First, lipid extraction was evaluated as pretreatment of *Chlorella vulgaris* (C) and *Desmodesmus subspicatus* (D) using two types of solvent mixtures: chloroform-methanol (CM) and ethanol-hexane (EH). As major result, the E/H mixture stands out as the best alternative for simultaneous lipids and biogas production. Biochemical composition of species and probable inhibition by the use of CM influenced AD process. In the second experiment, effect of pretreatments (ultrasound, microwave and hydrothermal) on solubilization of photosynthetic microorganisms' consortium biomass and presence of nutrients in AD were assessed. Solubilization content (17%) was obtained with hydrothermal pretreatment and CH₄ production for the *in natura* and pre-treated biomasses, with and without nutrients, did not present a significant difference, except for *in natura* biomass (190 ± 5.7 mL CH₄/gCOD) and pretreated with nutrients (160 ± 11.3 mL CH₄/gCOD). In the third experiment, biological pre-treatment of *C. vulgaris* was evaluated through endogenous cellulolytic enzymes activity (CMCase and FPase) of *Aspergillus niger* and *Trichoderma aureoviride* species. *A. niger* showed higher enzymatic activities (FPase: 0.103 ± 0.012 U/mL and CMCase: 0.873 ± 0.015 U/mL). Results indicates the feasibility of domestic effluent use as a culture medium for submerged fermentation, however, biological treatment did not favor the production of CH₄. In general, only the lipid extraction showed positive effects on biomass solubilization and, consequently, on the yields of CH₄.

Keywords: Digestion of algal biomass. Pre-treatments. Cellulase production. Domestic sewage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da digestão anaeróbia de biomassa de microalgas com possíveis locais de inibição	22
Figura 2 -	Visualização conceitual da incorporação da digestão anaeróbia na produção de biocombustível	23
Figura 3 -	Técnicas de pré-tratamentos de microalgas para a produção de metano	27
Figura 4 -	Figura esquemática do aparato utilizado para os testes de AME e PBM	42
Figura 5 -	Produção acumulada de CH ₄ em testes de BMP utilizando biomassa de <i>C. vulgaris in natura</i> : C-IN (■) e residual após extração de lipídios: CR-CM (●); CR-EH (▲)	56
Figura 6 -	Produção acumulada de CH ₄ em testes de BMP utilizando biomassa de <i>D. subspicatus in natura</i> : D-IN (■) e residual após extração de lipídios: DR-CM (●); DR-EH (▲)	57
Figura 7 -	Produção acumulada de CH ₄ (mL CH ₄) ajustada ao modelo de Gompertz. (a) <i>C. vulgaris</i> (b) <i>D. subspicatus</i> . IN (■), CM (●) e EH (▲)	60
Figura 8 -	Comparação entre as melhores condições encontradas para os pré-tratamentos por ultrassom, por micro-ondas e hidrotérmico, em termos de DQOs (mg/L) (■)	67
Figura 9 -	Produção acumulada de CH ₄ (mL CH ₄) nos testes de PBM após pré-tratamento. Biomassa <i>in natura</i> – IN (■), biomassa pré-tratada – PT (●), biomassa <i>in natura</i> + nutrientes – INN (▲) e biomassa pré-tratada + nutrientes – PTN (▼)	68
Figura 10 -	Produção acumulada de CH ₄ (mL CH ₄) ajustada ao modelo de Gompertz. (a) Sem adição de nutrientes: IN (■), PT (▶); (b) Com adição de nutrientes: IN+N (■), PT+N (●)	72
Figura 11 -	Produção acumulada de CH ₄ (mL CH ₄) em testes de PBM utilizando biomassa de <i>Chlorella</i> submetida à pré-tratamento enzimático. <i>Chlorella</i> controle: C-C (■) e pré-tratada (●).....	77
Figura 12 -	Produção acumulada de CH ₄ (mL CH ₄) ajustada ao modelo Gompertz. <i>Chlorella</i> controle: C-C (■) e pré-tratada (●)	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição química de microalgas (% matéria seca)	25
Tabela 2 -	Resumo das diferentes técnicas de pré-tratamento de microalgas para produção de metano	28
Tabela 3 -	Visão geral do objetivo, substrato e pré-tratamento para cada fase experimental	41
Tabela 4 -	Concentração dos reagentes para preparação das soluções nutrientes	43
Tabela 5 -	Variáveis e métodos analíticos utilizados na caracterização da biomassa	44
Tabela 6 -	Composição do meio comercial Provazzoli® com vitaminas do complexo B	46
Tabela 7 -	Descrição dos reatores (substratos) submetidos ao teste do PBM no experimento 1	47
Tabela 8 -	Variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial 2^2 para o pré-tratamento por ultrassom	48
Tabela 9 -	Variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial 2^2 para o pré-tratamento por micro-ondas	48
Tabela 10 -	Variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial 2^2 para o pré-tratamento hidrotérmico	49
Tabela 11 -	Descrição dos tratamentos utilizados para determinação da atividade celulolítica	52
Tabela 12 -	Caracterização da biomassa <i>in natura</i> e residual de <i>C. vulgaris</i> (C-IN) após extração com clorofórmio-metanol (CR-CM) e etanol-hexano (CR-EH). Média $\pm$ desvio padrão	53
Tabela 13 -	Caracterização da biomassa <i>in natura</i> e residual de <i>D. subspicatus</i> (D-IN) após extração com clorofórmio-metanol (DR-CM) e etanol-hexano (DR-EH). Média $\pm$ desvio padrão	54
Tabela 14 -	Média e desvio padrão dos níveis de lipídios extraídos por clorofórmio-metanol (CM) e etanol-hexano (EH)	54
Tabela 15 -	Produção acumulada de CH_4 (mL CH_4), produção específica	

	(mL CH ₄ /g DQO) e biodegradabilidade anaeróbia (%) para as condições testadas nos testes de PBM	58
Tabela 16 -	Parâmetros cinéticos dos testes de PBM usando o modelo de Gompertz	59
Tabela 17 -	Concentrações de nitrogênio amoniacal (NH ₄ ⁺) e ortofosfato (PO ₄ ³⁻), antes e após digestão anaeróbia	61
Tabela 18 -	Táxons identificados na biomassa utilizada como substrato	62
Tabela 19 -	Caracterização da suspensão de biomassa concentrada, com seus valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação (%)	62
Tabela 20 -	Variáveis e níveis codificados, relação DQOs/DQOt, energia apilacada (MJ/Kg ST) e percentual de solubilização (%) do planejamento fatorial 2 ² para o pré-tratamento por ultrassom	64
Tabela 21 -	Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,05$) do planejamento fatorial 2 ² para solubilização (%) da biomassa por ultrassom	64
Tabela 22 -	Variáveis e níveis codificados, relação DQOs/DQOt e percentual de solubilização (%) do planejamento fatorial 2 ² para o pré-tratamento por micro-ondas	65
Tabela 23 -	Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,05$) do planejamento fatorial 2 ² para solubilização (%) da biomassa por micro-ondas	65
Tabela 24 -	Variáveis e níveis codificados, relação DQOs/DQOt e percentual de solubilização (%) do planejamento fatorial 2 ² para o pré-tratamento hidrotérmico	66
Tabela 25 -	Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,05$) do planejamento fatorial 2 ² para solubilização (%) da biomassa pelo tratamento hidrotérmico	66
Tabela 26 -	ANOVA da produção de metano (P CH ₄) para as condições testadas no teste do potencial bioquímico de metano (PBM)	69
Tabela 27 -	Produção acumulada de CH ₄ (mL CH ₄), produção específica (mL CH ₄ /g DQO) e biodegradabilidade anaeróbia (%) para as condições testadas nos testes de PBM	69
Tabela 28 -	Parâmetros cinéticos dos testes de PBM usando o modelo de Gompertz	71

Tabela 29 -	Caracterização do efluente anaeróbio usado como meio de cultivo e da biomassa de <i>Chlorella</i> sp. utilizada como substrato indutor	73
Tabela 30 -	Valores máximos de atividades celulolíticas (FPase e CMCase) registrados para os diferentes tipos de tratamentos	74
Tabela 31 -	Parâmetros cinéticos dos testes de PBM usando o modelo de Gompertz	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos graxos voláteis
AME	Atividade Metanogênica Específica
APHA	<i>American Public Health Association</i>
CBHs	Celobiohidrolases
CH ₄	Metano
CMCase	Endoglucanases
CO ₂	Dióxido de carbono
D.A	Digestão anaeróbia
DQO	Demanda química de oxigênio
FPase	Exoglucanases + endoglucanases
FSm	Fermentação submersa
GHs	Glucanohidrolases
KHz	Quilohertz
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
NH ₄ ⁺	Nitrogênio amoniacal
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
PBM	Potencial bioquímico de metano (PBM)
pH.	Potencial hidrogeniônico
PO ₄ ³⁻	Fosfato
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TDH	Tempo de detenção Hidráulica
W	Potência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis	19
3.2	Digestão anaeróbia de microalgas e produção de metano	21
3.3	Pré-tratamentos	25
3.3.1	Pré-tratamentos térmicos	33
3.3.2	Pré-tratamentos mecânicos	33
3.3.3	Pré-tratamentos químicos	35
3.3.4	Pré-tratamentos biológicos	35
3.3.5	Comparação entre os métodos de pré-tratamento	37
3.4	Outros métodos para aumentar o rendimento de metano	38
3.4.1	Biorrefinaria	38
3.4.2	Co-digestão	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Inóculo	41
4.2	Testes de atividade metanogênica específica (ame) e de potencial bioquímico de metano (PBM)	42
4.3	Solução nutriente	43
4.4	Métodos analíticos	44
4.5	Biodegradabilidade anaeróbia	44
4.6	Estatística e parâmetros cinéticos	45
4.7	Experimento 1: Biomassa de <i>Chorella vulgaris</i> e <i>Desmodesmus subspicatus</i> submetidas à extração lipídica	45
4.7.1	Cultivo	45
4.7.2	Extração de lipídios totais	46
4.7.3	Teste do Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	47
4.8	Experimento 2: Biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos submetida à pré-tratamento para hidrólise celular	47
4.8.1	Substrato	47
4.8.2	Pré-tratamento e teor de solubilização (%)	47

4.8.3	Teste do Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	49
4.9	Experimento 3: Biomassa de <i>Clorella</i> sp. submetida a pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de micro-organismos fúngicos	50
4.9.1	Substrato	50
4.9.2	Micro-organismos	50
4.9.3	Preparo do inóculo	50
4.9.4	Meio de cultura e produção enzimática	51
4.9.5	Determinação da atividade celulolítica	51
4.9.6	Teste do Potencial Bioquímico de metano (PBM)	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Experimento 1: Biomassa de <i>Chorella vulgaris</i> e <i>Desmodesmus subspicatus</i> submetidas à extração lipídica	53
5.1.1	Caracterização das biomassas de microalgas <i>in natura</i> e residuais	53
5.1.2	Teste do potencial bioquímico de metano (PBM)	56
5.1.3	Solubilização de nutrientes	60
5.2	Experimento 2: Biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos submetida à pré-tratamento para hidrólise celular	62
5.2.1	Caracterização do substrato	62
5.2.2	Otimização das condições de pré-tratamento	63
5.2.3	Teste do potencial bioquímico de metano (PBM) em amostras tratadas hidrotermicamente	68
5.3	Experimento 3: Biomassa de <i>Clorella</i> sp. submetida a pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de micro-organismos fúngicos	72
5.3.1	Meio de cultura e substrato	72
5.3.2	Pré-tratamento e produção enzimática	73
5.3.3	Teste do potencial bioquímico de metano (PBM)	76
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por energia, associada aos impactos ambientais negativos causados pela queima de combustíveis fósseis, tem motivado a produção de biocombustíveis (BRENNAN e OWENDE, 2010; SAKARIKA e KORNAROS, et al. 2019). Uma abordagem promissora é o uso de microalgas como matéria-prima. Estudos desenvolvidos até o momento permitem concluir que a biomassa de microalgas é um tipo de substrato considerado como fonte potencial de matéria orgânica para fins energéticos (MENDEZ et al. 2015; SINGH et al. 2016; IEA, 2017). Esses micro-organismos são capazes de produzir grandes quantidades de biomassa, que pode ser convertida em diferentes subprodutos, como biodiesel, bioetanol ou biogás (IEA, 2010).

No processo de produção de biocombustíveis a partir microalgas, além do biodiesel, e da glicerina formada como subproduto, grandes quantidades de resíduos sólidos de biomassa são produzidos após a extração do conteúdo lipídico. Estes resíduos podem ser utilizados como fertilizantes, fontes de proteínas na dieta de ruminantes e alimentos para peixes (EHIMEN et al. 2011), ou ainda para a produção de maltodextrina, complemento alimentar e agente ligante na indústria farmacêutica (LAM et al. 2014). Entretanto, quando essas opções não forem viáveis, a biomassa precisa ser eliminada. Devido à alta demanda de nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo para o cultivo, o descarte dessa biomassa residual e o efluente de sua produção podem causar impactos ambientais e econômicos negativos, sendo a recuperação dessa biomassa e nutrientes altamente desejável para a sustentabilidade da produção de biodiesel (WARD et al. 2014; CHOWDHURY e FRANCHETTI, 2017).

Nesse contexto, a incorporação do processo de digestão anaeróbia na produção de biocombustíveis a partir de resíduos de microalgas oferece uma alternativa para eliminar alguns dos custos gerais, podendo aumentar o rendimento dos métodos de produção e favorecer o processo de conversão da biomassa ao biodiesel.

Sob outra perspectiva, a digestão anaeróbia é reconhecida por uma eficiência energética muito mais elevada em comparação com a produção de biocombustíveis descrita anteriormente (KLASSEN et al. 2016; JANKOWSKA et al. 2017). Ao contrário da produção de biodiesel, a extração de lipídios não é necessária, todas as macromoléculas (proteínas, lipídios e carboidratos) são utilizadas durante o processo e o principal produto gerado é o metano. Dessa forma, tanto a biomassa *in natura*, como os resíduos provenientes da produção de outros biocombustíveis podem ser utilizados

como substrato para o processo de digestão anaeróbia. Entretanto, o rendimento da produção de metano através desses micro-organismos é dependente das características das espécies utilizadas como substrato. Essa produção é muitas vezes limitada pela sua composição macromolecular, contendo biopolímeros capazes de resistir à degradação bacteriana, sendo necessária a aplicação de pré-tratamentos para promover a lise da parede celular e a solubilização da biomassa antes de ser submetida à digestão anaeróbia (WARD et al. 2014).

Os pré-tratamentos de microalgas, divididos como térmicos, mecânicos, químicos e biológicos (PASSOS et al. 2014c; CÓRDOVA et al. 2018), podem ser comparados com os processos de extração dos lipídios para produção de biodiesel, visto que também podem incluir esses tipos de pré-tratamentos no processo de extração. Desta forma, a extração de lipídeos pode ser considerada como um pré-tratamento (ALZATE et al. 2014; NEVES et al. 2016).

Os pré-tratamentos químicos foram relatados como eficazes, quando associado ao térmico (MENDEZ et al. 2014; PASSOS et al. 2016a). Em alguns métodos térmicos e mecânicos, a energia consumida no pré-tratamento não é compensada pelo ganho de metano (PASSOS et al. 2014c). Por outro lado, o pré-tratamento biológico, apesar de ter rendimento de metano mais baixo que os pré-tratamentos térmicos é promissor devido à baixa necessidade de energia (PASSOS et al. 2016b). Nesta alternativa, o uso de enzimas exógenas comerciais apresenta como desvantagens o custo e a complexidade para formular a mistura enzimática ótima. Para tornar o processo rentável, enzimas endógenas podem ser usadas para o pré-tratamento biológico *in situ*.

Nesse contexto, a presente pesquisa avaliou a influência de diferentes pré-tratamentos para a produção de metano a partir de biomassa algal. Para esse propósito, foram realizados testes de potencial bioquímico de metano (PBM) em biomassas submetidas à extração lipídica, pré-tratadas termicamente ou por enzimas endógenas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram divididos em objetivo geral e objetivo específico.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de diferentes pré-tratamentos na produção de metano a partir de biomassa algal.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o potencial de produção de metano a partir da biomassa residual de *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus* após pré-tratamento por extração lipídica;
- Avaliar o potencial de produção de metano a partir da digestão anaeróbia da biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos, submetida à técnica de pré-tratamento para hidrólise celular;
- Avaliar o potencial de produção de metano da biomassa de *Chlorella* sp. submetida à pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de fungos filamentosos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nas subseções seguintes apresentam o estado da arte e os conceitos necessários para uma melhor compreensão em torno da pesquisa realizada sobre os pré-tratamentos utilizados para produção de metano a partir da biomassa algal.

3.1 Microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis

Com a crise energética, o uso de combustíveis derivados do petróleo tem sido amplamente reconhecido como insustentável, devido, principalmente, às previsões de esgotamento dessa matéria-prima e a acumulação de dióxido de carbono (CO₂) no ambiente (CHISTI, 2007). Estima-se que a taxa de consumo de petróleo é 105 vezes mais rápida do que a natureza possa repor. Além disso, o rápido crescimento da população leva a crescentes demandas de energia, que deverão aumentar em 50% ou mais até 2030 (SHUBA e KIFLE, 2018). Dessa forma, a busca por energia “limpa” tornou-se um desafio, com ênfase à produção de biocombustíveis como fontes de energia (MATA et al. 2010; GUPTA e TUOHY, 2013; SHUBA e KIFLE, 2018).

As investigações sobre a produção de biocombustíveis usando fontes alternativas foram propostas na década de 1950, recebendo maior incentivo com a crise do petróleo em 1970 (RATHA e PRASANNA, 2012). O potencial para a utilização da biomassa de microalgas, como matéria-prima para a produção de bioenergia, tem sido amplamente discutido na literatura (MILANO et al. 2016; SHUBA e KIFLE, 2018; RASLAVIČIUS et al. 2018; SAJJADI et al. 2018; SAKARIKA e KORNAROS et al. 2019). O maior conhecimento sobre a bioquímica desses micro-organismos, nas décadas de 1980 e 1990, os indicou como uma alternativa promissora de energia, e vários países passaram a disputar a liderança no desenvolvimento de tecnologias eficientes e economicamente viáveis para esta finalidade (RATHA e PRASANNA, 2012).

As microalgas são os únicos organismos conhecidos, até o momento, que são capazes de realizar fotossíntese e produção de hidrogênio por processo fotobiológico. Além disso, pesquisas têm sido realizadas sobre a extração de lipídios para produção de biodiesel e combustível de aviação, a síntese de isoprenóides e hidrocarbonetos para produção de gasolina e carboidratos para produção de etanol (RAHEEM, et al. 2018). A biomassa também pode ser processada para gaseificação hidrotermal, para produção de

hidrogênio ou metano (PATEL et al. 2016), produção de biogás por digestão anaeróbia e combustão direta para produção de eletricidade (PAMAR et al. 2011).

Além do seu potencial como cultura energética, as microalgas possuem capacidade de bioremediar efluentes (SHUBA e KIFLE, 2018) e podem ser usadas, diretamente, como fontes de alimento ou matéria-prima para várias biomoléculas importantes, como antioxidantes, corantes, produtos farmacêuticos e compostos bioativos (PARMA et al. 2011; GAIGNARD et al. 2019).

Estes micro-organismos fotossintéticos são capazes de converter a energia solar, água e dióxido de carbono (CO_2) em biomassa (DEMIRBAS, 2011). Normalmente, a produção de 1 kg de biomassa de microalgas requer 1,83 kg de CO_2 (CHISTI, 2007). Algumas espécies são altamente produtivas, capazes de produzir grandes quantidades de biomassa de forma mais eficiente do que as práticas de cultivos existentes para culturas terrestres, necessitando de um menor requerimento do uso de terras para sua produção, não competindo com a produção de alimento. Além disso, o uso da biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis não ocasionam problemas como eutrofização, depleção de recursos naturais (principalmente os recursos hídricos) e redução da biodiversidade como ocorre com biomassa proveniente de práticas agrícolas (WARD et al. 2014).

Podem crescer em diversos ambientes, podendo, inclusive ser cultivadas em águas residuais, reduzindo o custo associado ao uso de nutrientes e água doce (RAMSUNDAR et al. 2016; POSADAS et al. 2017). Muitas espécies podem acumular mais de 60% de lipídios em peso seco (DEMIRBAS, 2011) e o biocombustível produzido a partir dessa biomassa não contém enxofre, não é tóxico, é altamente biodegradável, podendo ainda reduzir as emissões de carbono (DEMIRBAS, 2011).

Apesar das vantagens citadas, a produção de biocombustíveis de microalgas em grande escala apresenta alguns desafios econômicos, operacionais e energéticos, principalmente, em relação ao cultivo, métodos de colheitas e processos posteriores à produção. A demanda por fertilizantes, devido à significativa utilização de nutrientes para cultivo, o alto consumo de energia necessária para a colheita e desidratação da biomassa, assim como para extração de lipídios e outros processos de conversão, estão entre os principais fatores que dificultam o processo (WARD et al. 2014; JANKOWSKA et al. 2017; KLEIN et al. 2018).

Para tentar reverter essas restrições técnicas e econômicas, novas pesquisas na área da engenharia genética e metabólica de cepas de microalgas têm sido realizadas

(MEDIPALLY et al. 2015; SHUBA e KIFLE, 2018). Além disso, a colheita de microalgas através da biofloculação, auxiliada por fungos, tem mostrado ser um método emergente, eficiente e rentável (PRAJAPATI, et al. 2016; CHEN et al. 2018; YANG, et al. 2019). Outra estratégia investigada, o conceito de biorrefinaria de microalgas, compreende a utilização de todos os compostos da biomassa e agrega todos os processos tecnológicos, desde o cultivo até a geração do produto final (TRIVEDI et al. 2015; JANKOWSKA, et al. 2017; LAURENS et al. 2017; RAHEEM et al. 2018; SHUBA e KIFLE, 2018).

Apesar das limitações relacionadas aos biocombustíveis, as pesquisas continuam focadas na produção do biodiesel. A geração de biogás através da digestão anaeróbia de microalgas é reconhecida por uma eficiência energética muito mais elevada em comparação à produção de biocombustíveis descrita anteriormente (KLASSEN et al. 2016; JANKOWSKA et al. 2017). Além disso, a produção de biodiesel a partir de microalgas tem mostrado viabilidade quando associada à digestão anaeróbia da biomassa residual, após a extração de lipídios (SIALVE et al. 2009; JANKOWSKA et al. 2017).

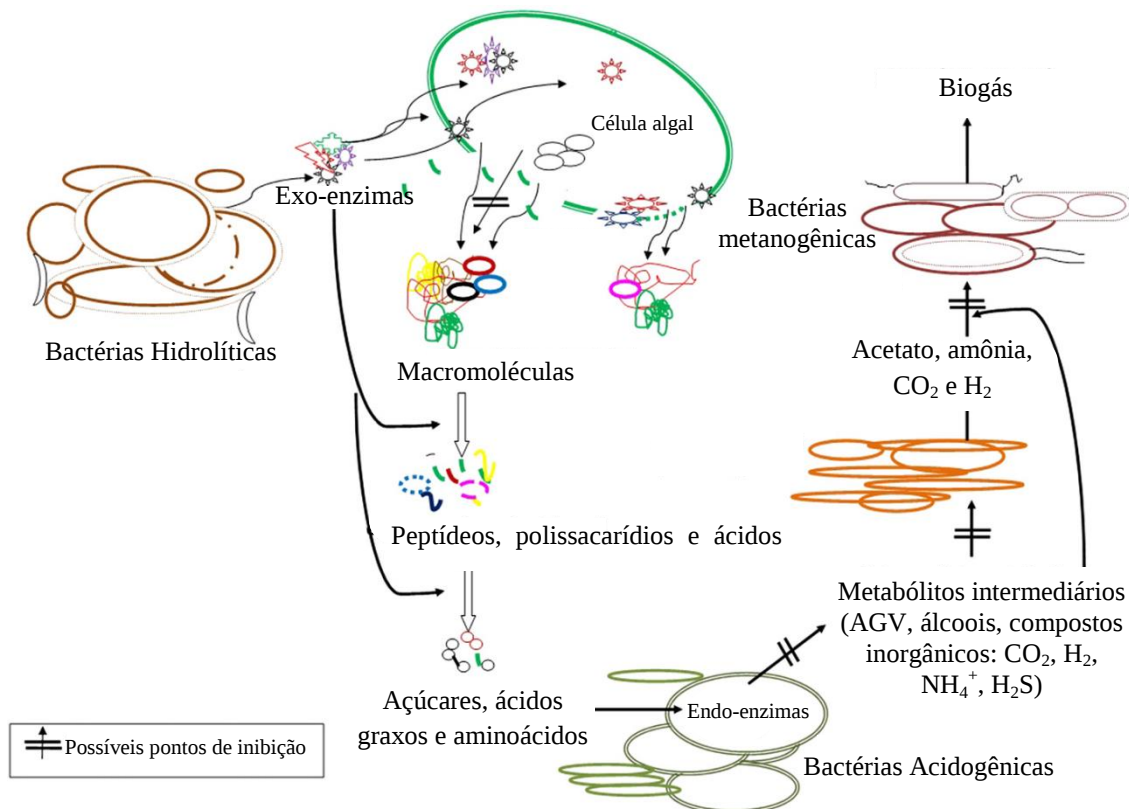
3.2 Digestão anaeróbia de microalgas e produção de metano

A digestão anaeróbia (DA) é uma tecnologia promissora, que tem ganhado atenção, devido às suas vantagens associadas ao tratamento de vários tipos de substratos, ao mesmo tempo em que produz energia renovável. O processo de DA compreende a decomposição da matéria orgânica sob um ambiente desprovido de oxigênio, utilizando substratos como resíduos agrícolas, esterco animal, lodo, microalgas e macroalgas, entre outros. O processo ocorre por reações bioquímicas complexas, envolvendo a degradação de carbono orgânico em ácidos orgânicos e biogás (CAVINATO et al. 2017).

O biogás é uma mistura gasosa composta principalmente de metano (em torno de 65%), que é o carbono no estado mais reduzido, e o dióxido de carbono (aproximadamente 35%), que é o estado mais oxidado. Outros gases secundários (normalmente menos de 1%), incluindo hidrogênio (H_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), nitrogênio (N_2), amônia (NH_3) também são formados (ANGELIDAKI e SANDERS, 2004).

O processo de DA consiste em 4 passos principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, realizados com o auxílio de diferentes grupos de bactérias: (I) bactérias hidrolíticas: produzem exoenzimas para promover a lise da parede celular das microalgas e a degradação das macromoléculas, tais como lipídios, carboidratos e proteínas para ácidos graxos de cadeia longa e glicerol, açúcares solúveis (mono e dissacarídeos) e aminoácidos; (II) bactérias acidogênicas: convertem os compostos gerados no processo de hidrólise em substâncias simples, como ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia curta, álcoois, ácido láctico e compostos inorgânicos (CO_2 , H_2 , NH_4^+ , H_2S , etc.); (III) bactérias acetogênicas: convertem os metabólicos intermediários em ácido acético, dióxido de carbono e hidrogênio; (IV) bactérias metanogênicas acetoclásticas: converte acetato em metano e dióxido de carbono enquanto as metanogênicas hidrogenotróficas utilizam o hidrogênio como doador de elétrons e dióxido de carbono como aceptor de elétrons para produzir metano (APPELS et al. 2008; PRAJAPATI et al. 2013). Na Figura 1 é possível observar a representação esquemática da digestão anaeróbia da biomassa de microalgas.

Figura 1 - Representação esquemática da digestão anaeróbia de biomassa de microalgas com possíveis locais de inibição

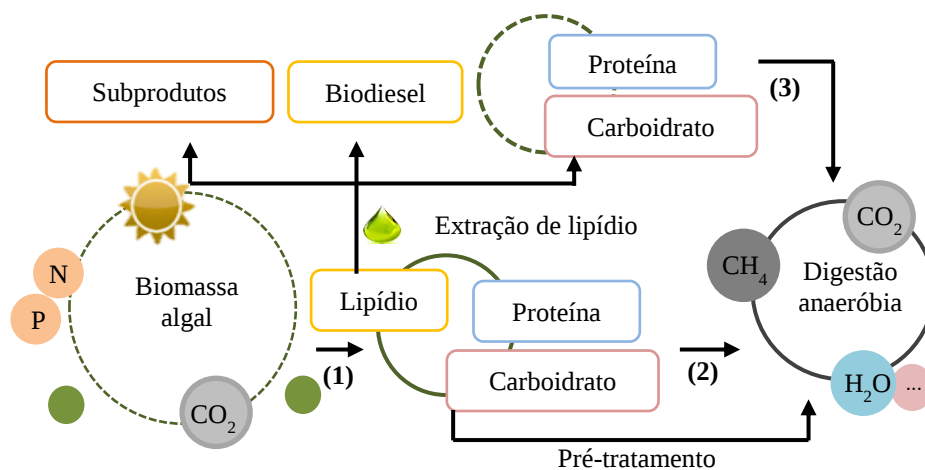


Fonte: Prajapati et al. (2013)

A digestão anaeróbia de biomassa de microalgas foi estudada pela primeira vez na década de 1950 por Golueke et al. (1957). Os autores foram os primeiros a avaliarem a viabilidade da conversão de energia solar a metano, por meio da fixação da luz solar pelas microalgas, seguido pela digestão anaeróbia. Foram realizadas cinco séries de experimentos sobre digestão de microalgas, onde se avaliou: as microalgas como fonte de substrato (comparando com lodo de esgoto), o efeito da temperatura, o efeito de floclulantes, o período de detenção e a carga orgânica utilizada. Os resultados obtidos indicaram que as algas cultivadas em efluentes domésticos, separadas por floclulação, foram imediatamente digeridas em condições adequadas. O melhor desempenho do digestor foi obtido a 50 °C, com período de detenção de 11 a 30 dias.

Nas últimas décadas, algumas abordagens foram avaliadas para a produção de metano a partir de microalgas utilizando a tecnologia anaeróbia: (1) Digestão anaeróbia da biomassa “*in natura*”, após a colheita e concentração; (2) Digestão anaeróbia da biomassa de microalgas submetida a algum tipo de pré-tratamento; (3) Digestão anaeróbia da biomassa residual, após extração do conteúdo lipídico (WARD et al. 2014; PASSOS et al. 2014c).

Figura 2 - Visualização conceitual da incorporação da digestão anaeróbia na produção de biocombustível



Fonte: A autora (2019)

O rendimento teórico de metano por microalgas foi estimado em 480-800 mL $\text{CH}_4/\text{g SV}$, no entanto, efetivamente, as microalgas apresentam menor rendimento em relação aos valores teóricos (SIALVE et al. 2009).

A digestão anaeróbia de uma cultura pura de *Chlorella vulgaris* apresentou rendimento de 240 mL $\text{CH}_4/\text{g SV}$ e 51% de remoção de DQO em 28 dias de TDH (RAS

et al. 2011), enquanto que uma biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* apresentou rendimento de 587 mL CH₄/g SV (MUSSGNUM et al., 2010). Por outro lado, a produção de metano das cianobactérias *Aphanizomenon ovalisporum* (223,1 ± 6,3 mL CH₄ g/DQO), *Anabaena planctonica* (187,6 ± 20,3 mL CH₄ g/DQO), *Borzia trilocularis* (168,3 ± 16,2 mL CH₄ g/DQO) e *Synechocystis* sp. (220,4 ± 25,1 mL CH₄ g/DQO), quando comparadas com *Chlorella vulgaris* (125,6 ± 4,6 mL CH₄ g/DQO) atingiram valores mais elevados (MENDEZ, et al. 2015).

Essa elevada variabilidade apresentada no rendimento de metano demonstra que o potencial de produção é específico da espécie e está relacionado a dois aspectos principais: a composição macromolecular e as características da parede celular. (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al. 2011; MUSSGNUM et al. 2010). A diferença apresentada na biodegradabilidade anaeróbica, devido à composição macromolecular das espécies, consiste no potencial de metano dos diversos compostos orgânicos presentes nas células de microalgas (PASSOS et al. 2014).

Dependendo da espécie, a biomassa pode ser rica em carboidratos, proteínas ou lipídios, ou possuir uma composição equilibrada dessas biomoléculas. Estequiometricamente, lipídios (1,014 L/g SV), seguidos por proteínas (0,851 L/g SV) e carboidratos (0,415 L/g SV) apresentam um maior rendimento teórico de metano (SIALVE et al. 2009). A partir dos dados da Tabela 1, pode-se concluir que a composição bioquímica e, conseqüentemente, o potencial de biometanização, varia de acordo com as espécies.

Um desafio enfrentado ao lidar com a digestão anaeróbia de microalgas é toxicidade da amônia. Como as células desses micro-organismos podem apresentar elevados teores de proteína (50–60%), a elevada concentração de amônia (NH₄⁺) dissolvida durante a degradação de proteínas, na etapa de hidrólise, pode ser tóxica às bactérias metanogênicas, com potencial inibidor (SIALVE et al. 2009).

Em relação à parede celular das microalgas, sua estrutura é geralmente rígida, composta, principalmente, por compostos orgânicos de baixa biodegradabilidade e/ou disponibilidade, como celulose e hemicelulose, que tornam a conversão lenta, necessitando de maior tempo para digestão (PASSOS et al. 2014c; CÓRDOVA et al. 2018; SARATALE et al. 2018). Diante disso, técnicas de pré-tratamento foram aplicadas para promover a solubilização da biomassa particulada e aumento no rendimento de metano.

Tabela 1 - Composição química de microalgas (% matéria seca)

Espécies	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)
Chlorophyceae			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	48	17
<i>Chlorella minutissima</i>	31	-	-
<i>Chlorella protothecoides</i>	55	10-52	10-15
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	57	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-22	51-58	12-17
<i>Dunaliella salina</i>	6	57	32
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	-	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	35-55	50-56	10-17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9	47	
Cyanophyceae			
<i>Anabaena cylindrical</i>	4-7	43-56	25-30
<i>Spirulina maxima</i>	6-7	60-71	13-16
<i>Spirulina platensis</i>	4-9	46-63	8-14
<i>Synechococcus sp.</i>	11	63	15
Bacillariophyceae			
<i>Navicula saprophila</i>	~51	-	-
<i>Nitzschia closterium</i>	27	-	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	39	58	10
<i>Chaetoceros muellerii</i>	33	44-65	11-19
Rhodophyceae			
<i>Porphyridium cruentum</i>	9-14	28-39	40-57
Dinophyceae			
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20	-	-
Euglenophyceae			
<i>Euglena gracilis</i>	4-20	39-61	14-18
Prymnesiophyceae			
<i>Isochrysis galbana</i>	21-38	30-45	7-25
<i>Prymnesium parvum</i>	22-38	28-45	25-33

Fonte: Adaptado de Mata et al. (2010)

3.3 Pré-tratamentos

Os primeiros estudos sobre a digestão de microalgas observaram a resistência da estrutura das paredes celulares desses micro-organismos ao verificar que uma fração de microalgas não digeridas e intactas, após um TDH de 30 dias (GOLUEKE et al. 1957). A partir disso, diferentes pré-tratamentos foram aplicados a uma biomassa de microalgas cultivadas em lagoas de tratamento de águas residuais. O efeito da temperatura, duração do tratamento, o substrato e a adição de hidróxido de sódio foram investigados. O tratamento mais eficaz foi relacionado à temperatura e consistiu no

aquecimento a 100 °C durante 8 h, resultando em um aumento de 33% na produção de metano (CHEN e OSWALD, 1998).

Baseado nesses resultados, as técnicas de pré-tratamento foram consideradas uma etapa necessária para promover a lise celular das microalgas e a produção de metano a partir desses micro-organismos. No entanto, a eficiência do pré-tratamento depende das características da parede celular das microalgas (PASSOS, et al. 2014c).

Uma característica comum à maioria dos micro-organismos fotossintéticos é a presença de compostos recalcitrantes como a esporopolenina e algaenano. Este último é um biopolímero não hidrolisável, que tem sido descrito em várias espécies utilizadas para a produção de biocombustíveis (*Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Pediastrum boryanum* e *Chlorella vulgaris* (BILLER, et al. 2015).

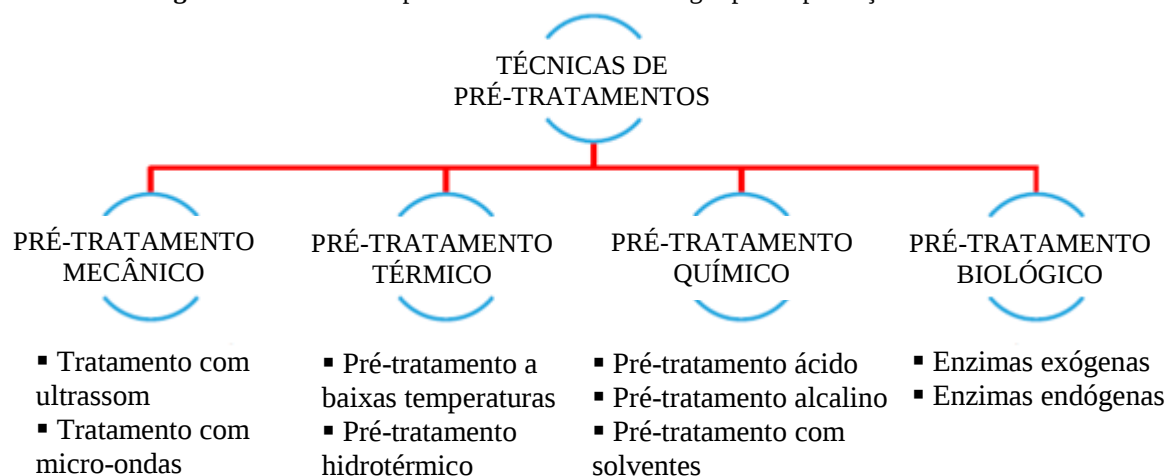
Espécies de microalgas sem parede celular (por exemplo, a *Dunaliella* sp.) ou contendo parede celular de glicoproteína (por exemplo, *Chlamydomonas* sp. e *Euglena* sp.) apresentaram rendimentos de metano mais elevados do que as de parede celular mais complexa, contendo compostos recalcitrantes (por exemplo, *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp.) (MUSSGUNG et al. 2010). As microalgas da espécie *Scenedesmus* sp., por exemplo, possuem uma das paredes celulares mais resistentes, devido à composição de camadas múltiplas de celulose e hemicelulose no interior e esporopolenina do lado externo (GONZALEZ-FERNANDEZ et al. 2011).

As técnicas de pré-tratamento têm a finalidade de romper a parede celular das microalgas, reduzindo o tamanho das partículas, tornando compostos recalcitrantes em substâncias solúveis. Além disso, pode hidrolisar ou desativar materiais tóxicos (BOHUTSKYI e BOUWER et al. 2013). De fato, para que os pré-tratamentos produzam efeitos positivos, é importante que o conteúdo dos materiais orgânicos da biomassa seja conservado e seja evitada a formação de substâncias inibitórias e/ou tóxicas que afetam o processo de digestão anaeróbia (CÓRDOVA, et al. 2018).

Os principais tipos de pré-tratamento podem ser divididos em quatro categorias: mecânicos, térmicos, químicos e biológicos (Figura 3). Os pré-tratamentos mecânicos e térmicos foram relatados como os mais eficientes para desintegração da parede celular de microalgas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, et al. 2012b; PASSOS e FERRER, 2015; PASSOS et al. 2015a). Os pré-tratamentos químicos foram relatados como eficazes, predominantemente por acoplamento térmico, no entanto, a utilização de produtos químicos pode contaminar os subprodutos (MENDEZ et al. 2013; PASSOS et al. 2016a). Os pré-tratamentos biológicos, associados ao uso de enzimas exógenas e

produção de enzimas *in situ* têm sido relatados como viáveis para alcançar melhores rendimentos de metano (PRAJAPATI et al. 2016).

Figura 3 - Técnicas de pré-tratamentos de microalgas para a produção de metano



Fonte: Adaptado de Canivato et al. (2017)

Os pré-tratamentos mecânicos e térmicos foram relatados como os mais eficientes para desintegração da parede celular de microalgas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, et al. 2012b; PASSOS e FERRER, 2015; PASSOS et al. 2015a). Os pré-tratamentos químicos foram relatados como eficazes, predominantemente por acoplamento térmico, no entanto, a utilização de produtos químicos pode contaminar os subprodutos (MENDEZ et al. 2013; PASSOS et al. 2016a). Os pré-tratamentos biológicos, associados ao uso de enzimas exógenas e produção de enzimas *in situ* têm sido relatados como viáveis para alcançar melhores rendimentos de metano (PRAJAPATI et al. 2016). As secções seguintes resumem o estado da arte das técnicas de pré-tratamento para melhorar a produção de biogás a partir da biomassa de microalgas. O resumo de diferentes técnicas de pré-tratamento de microalgas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo das diferentes técnicas de pré-tratamento de microalgas para produção de metano

Espécie	Condições do reator e relação S/I	Pré-tratamento	Condições operacionais	Produção de metano	Referência
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	32 dias, 38 °C	Secagem	105 °C (24 h)	306 mL CH ₄ /g SV	Mussgnug et al. (2010)
<i>Dunaliella salina</i>				323 mL CH ₄ /g SV	
<i>Arthrospira platensis</i>				239 mL CH ₄ /g SV	
<i>Euglena gracilis</i>				325 mL CH ₄ /g SV	
<i>Chlorella kessleri</i>				168 mL CH ₄ /g SV	
<i>Scenedesmus obliquus</i>				35,5 mL CH ₄ /g SV	
A: 40% <i>Chlamydomonas</i> , 20% <i>Scenedesmus</i> , 40% <i>Nannocloropsis</i> .	60 dias, 35 °C 1 g SV/g SV	Térmico	110 °C, 1 bar; 140 °C, 1.2 bar; 170 °C, 6.4 bar	A= 398 mL CH ₄ /g SV (T3); B= 307 mL CH ₄ /g SV (T3); C= 413 mL CH ₄ /g SV (T1)	Alzate et al. (2012)
B: 58% <i>Acutodesmus obliquus</i> , 36% <i>oocystis sp.</i> , 1% <i>phormidium</i> , 5% <i>nitzschia</i>		Ultrassom	U1 = 10,000 kJ/kg ST, U2 = 27,000 kJ/kg TS, U3 = 40,000 kJ/kg TS U4 = 57,000 kJ/kg TS	A=310 mL CH ₄ /g SV (U1); B=223 mL CH ₄ /g SV (U3,U4); C=0.314 L CH ₄ /g SV (U1)	
C: <i>microspora</i>		Tratamento Biológico	105 °C , 12 h, 24 h	A= 262 mL CH ₄ /g SV (B1); B= 193 mL CH ₄ /g SV (B1); C= 266 mL CH ₄ /g SV (B1,B2)	
<i>Scenedesmus sp.</i>	34 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Térmico	70 °C, 15 min	89 mL CH ₄ /g DQO	González-Fernández (2012)
		Ultrassom	90 °C, 15 min	129 mL CH ₄ /g DQO	
		Mecânico	130 MJ/kg, 30 min	154 mL CH ₄ /g DQO	

<i>Scenedesmus sp.</i> .	32-40 dias, 37 °C 0,5 g SV/g SV	Térmico	Extração de aminoácidos, hidrólise enzimática	273 mL CH ₄ /g SV	Ramos-Suárez e Carreras (2014)
		Químico	Extração de lipídios, hexano, método Soxhelt	212 mL CH ₄ /g SV	
<i>Isochrysis galbana</i>	15 dias, 30 °C	Mecânico	Agitação com 1 g de esferas de vidro, t = 1 min	10 mL CH ₄ /g SV	Santos, et al. (2014)
		Químico	40 °C, 0.2%v/v ácido, t=16 h	16,4 mL CH ₄ /g SV	
		Térmico	60 °C, t=16 h	2,87 mL CH ₄ /g SV	
		Térmico	40 °C, t=16 h	2,29 mL CH ₄ /g SV	
Biomassa mista de microalgas	15 dias, 35 °C	Micro-ondas	900 W, t=3 min 110, 200 kJ/kgVS	130 mL CH ₄ /gSV	Passos et al. (2014b)
	20 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV			170 mL CH ₄ /gSV	
<i>Monoraphidium sp.</i> e <i>Stigeoclonium sp.</i> <i>Nitzschia sp.</i> e <i>Amphora</i> <i>sp.</i>	58 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Ultrassom	Potência 50, 60 e 70 W	Controle: 147,7 mL CH ₄ /g SV	Passos et al. (2014a)
			Tempo de exposição 10, 20 e 30 min	196,4 mL CH ₄ /g SV (P: 70 W, T: 30 min)	
<i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Ankistrodesmus</i> , <i>Monoraphidium</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Nitzschia</i>	43 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Térmico	T1= 55 °C, 5h	T1= 123,88 mL CH ₄ /g SV	Passos et al. (2013b)
			T2=55 °C, 10h	T2= 125,59 mL CH ₄ /g SV	
			T3=55 °C, 15h	T3=127,43 mL CH ₄ /g SV	
			T4= 75 °C, 5h	T4= 125,67 mL CH ₄ /g SV	
			T5=75 °C, 10h	T5=154,59 mL CH ₄ /g SV	
			T6=75 °C, 15h	T6=160,42 mL CH ₄ /g SV	
			T7= 95 °C, 5h	T7= 146,95 mL CH ₄ /g SV	
			T8=95 °C, 10h;	T8=169,88 mL CH ₄ /g SV	
			T9=75 °C, 15h	T9=168,75 mL CH ₄ /g SV	

<i>Chlorella e Scenedesmus</i>	29 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Térmico	T1= 140 °C 10 min T2= 140 °C 20 min T3= 160 °C 10 min T4= 160 °C 20 min T5= 180 °C 10 min T6= 180 °C 20 min	T1= 219,8 mL CH ₄ /g DQO T2= 225,8 mL CH ₄ /g DQO T3= 256,3 mL CH ₄ /g DQO T4= 258,9 mL CH ₄ /g DQO T5= 226,5 mL CH ₄ /g DQO T6= 231,8 mL CH ₄ /g DQO	Mendez et al. (2014)
<i>Scenedesmus sp.</i>	33 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Térmico	70 °C, 15 min (banho maria) 90 °C, 15 min (banho maria)	85 mL CH ₄ /g DQO 170 mL CH ₄ /g DQO	González- Fernández (2012a)
<i>Oocystis sp.</i>	28 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Hidrotérmico	110°C, 1,2 bar 15 min 110°C, 1,2 bar 30 min 130°C, 1,7 bar 15min 130°C, 1,7 bar 30 min	Controle: 120 mL CH ₄ /g SV 150 mL CH ₄ /g SV 140 mL CH ₄ /g SV 170 mL CH ₄ /g SV 160 mL CH ₄ /g SV	Passos e Ferrer (2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	30 dias, 35 °C 0,5 g DQO/g SV	Termoquímico	120 °C, t=20 min 120 °C, t=40 min 120 °C, t=40 min+4 M H ₂ SO ₄ in pH=2 120 °C, t=40 min+4 M NaOH in pH=10 4 MH ₂ SO ₄ in pH=2 0	180 mL CH ₄ /gDQO 268 mL CH ₄ /gDQO 229 mL CH ₄ /gDQO 241 mL CH ₄ /gDQO 113 mL CH ₄ /gDQO	Mendez, et al. (2013)

<i>Chlorella</i> sp., <i>Monoraphidium</i> sp.	32 dias, 35 °C 0,5 g SV/g SV	Termoquímico	Térmico 80 °C, 2 h Termoquímicos: 0,5%, 1,25% e 2,0% (w / w) Ácido (HCL) e Alcalino (KOH)	T (80 °C, 2 h) 125,98 mL CH ₄ /g SV (0.5% HCL, 80°C, 2 h) 142,50 mL CH ₄ /g SV (0.5% KOH, 80°C, 2 h) 145,10 mL CH ₄ /g SV	Passos et al. (2016a)
<i>Chlorella</i> sp.	38 dias, 37 °C	Transesterificação convencional Transesterificação convencional Transesterificação <i>in situ</i>	1. 188 mL de 1-butanol (90 min, 90 °C) 2. 150 mL de clorofórmio- metanol (30 min, 35 °C) 3. 60 mL de metanol e 2,2 mL de ácido sulfúrico (8h, 60 °C)	1. 267,5 mL CH ₄ / g SV 2. Não houve produção 2. 222 mL CH ₄ / g SV	Ehimen et al. (2009)
<i>Scenedesmus</i> sp.	35 dias, 38 °C	Extração de lipídios Térmica	Hexano, método Soxhelt, t=6 h 170 °C, 800 kPa, t=30 min	330 mL CH ₄ /g SV 240 mL CH ₄ /g SV	Keymer et al. (2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella protothecoides</i>	45 dias, 35 °C	Extração de lipídio	Clorofórmio/metanol (1:2 v/v), método Soxhelt 0,3 g SV/g SV 0,5 g SV/g SV	Não houve produção	Tercero et al. (2014)

<i>Chlorella vulgaris</i>	41 dias, 35 °C 0,5 g SV/g SV	Extração de lipídio	Etanol-hexano (2.5:1v/v), método Soxhelt	150,2 ± 14,6 mL CH ₄ g/SV	Sforza et al. (2017)
<i>Oocystis</i> sp. e diatomáceas	45 dias, 35 °C 0,5 g SV/g SV	Enzimático	Enzimas: 0,5 e 1% v/v Tempo de exposição de 6h, 12h, 24h e 48h	Celulase: 203 mL CH ₄ /g SV Mistura de enzimas: 217,3 mL CH ₄ /g SV	Passos et al. (2016b)
Cultura mista de microalgas	32 dias, 35 °C 0,5 g SV/g SV	Enzimático	Laccase comercial e extrato fúngico <i>Trametes versicolor</i> 100 UL ⁻¹ , 20 min, 25 °C, 100 rpm	Pré-tratamento com laccase comercial: 100 ± 7 mL CH ₄ /g SV Pré-tratamento com extrato fúngico: 144 ± 2 mL CH ₄ /g SV	Hom-Diaz et al. (2016)
<i>Chroococcus</i> sp.	30 dias, 37 °C 0,3 g SV/g SV	Enzimático	(60 °C) and pH (5.0) Extrato fúngico <i>Aspergillus</i> <i>lentulus</i>	324,38 mL CH ₄ g SV	Prajapati et al. (2015b)
<i>Scenedesmus</i> (98%), <i>Keratococcus</i> (1%)	12 dias, 35 °C 0,5 g SV/g SV	Fluido ruminal Micro-organismo hidrolíticos	v=80 mL, 35 °C, 100 rpm, 7 dias	193 mL CH ₄ /g DQO	Trinidad et al. (2017)

Fonte: Adaptado de Jankowska et al. (2017)

3.3.1 Pré-tratamentos térmicos

O pré-tratamento térmico ocorre através da inserção de calor na biomassa de microalgas com o intuito de romper as ligações químicas da parede celular e, alcançar uma maior solubilização dos componentes celulares. Essa alternativa pode ser aplicada de duas formas: apenas com aplicação de calor na biomassa (pré-tratamento térmico) ou numa combinação de calor com pressão (pré-tratamento hidrotérmico) (KENDIR e UGURLU, 2018). O calor é fornecido para biomassa através de banho-maria, autoclave ou câmaras de calor. Além disso, o pré-tratamento térmico pode ser realizado através do processo de congelamento e descongelamento da biomassa (JANKOWSKA et al. 2017).

As faixas de temperatura aplicadas no pré-tratamento térmico variam de 50 °C a 270 °C. No entanto, o espectro ótimo de temperatura depende das características do substrato. Diversos estudos já mostraram que para aumentar a produção de metano de microalgas, a faixa de temperatura a ser aplicada está entre 55 e 170 °C (PASSOS et al. 2014c; KENDIR e UGURLU, 2018). Temperaturas muito elevadas podem gerar compostos recalcitrantes, dificultando a digestão anaeróbia e produção de biogás (KENDIR e UGURLU, 2018).

Apesar de alguns estudos mostrarem que a biomassa de microalgas tratada termicamente pode melhorar a produção de biogás (GONZALEZ-FERNANDEZ et al. 2012a; PASSOS e FERRER, 2015; SANZ et al. 2017) ainda é relatado que essa é uma alternativa limitada para melhorar a produção de metano (DE SCHAMPHELAIRE e VERSTRAETE 2009; AYALA-PARRA et al. 2017a). Apesar do custo energético envolvido e das dificuldades ainda encontradas no aprimoramento dessa tecnologia, o pré-tratamento térmico tem um grande potencial para aplicação contínua e em larga escala (KENDIR e UGURLU, 2018).

3.3.2 Pré-tratamentos mecânicos

Neste tipo de pré-tratamento, as células das microalgas são rompidas por meio da aplicação de uma força física. Esta técnica é menos dependente das espécies de microalgas. Embora seja efetivo, o pré-tratamento mecânico demanda muito gasto energético. As técnicas mais aplicadas são moagem, ultrassom e micro-ondas.

No tratamento por ultrassom ocorre a ruptura da parede celular e solubilização da matéria orgânica através de ondas sonoras em uma frequência acima do audível ao ser humano. Ciclos contínuos de compressão e descompressão de ondas sonoras geram cavitação

dentro das células, formando regiões contendo vapor líquido, chamadas de microbolhas, que se formam pelo movimento das moléculas líquidas. A depender da intensidade do ultrassom, as microbolhas são comprimidas e implodem, produzindo radicais livres, alta pressão e ondas de choque, danificando a parede celular. O resultado depende das espécies de microalgas e condições do pré-tratamento, tais como a concentração da biomassa, tempo de exposição, energia aplicada e temperatura (KIM et al. 2013).

Frequências baixas (< 50 kHz) e altas (>50 kHz) de ultrassom podem ser aplicadas. Contudo, as mais baixas favorecerão os efeitos mecânicos, enquanto as mais altas favorecem a formação de radicais livres (PASSOS et al. 2014c). Os resultados variam de acordo com as espécies de algas e com as condições de tratamento.

Passos et al. (2014a) aplicaram vários níveis de energia específica (de 16,0 a 67,2 MJ kg^{-1} ST) para o pré-tratamento de uma biomassa de microalgas proveniente de uma instalação piloto de lagoa de alta taxa tratando esgoto real. Os autores obtiveram baixa solubilização da biomassa (16-17%) quando aplicaram energia específica abaixo de 22,4 MJ kg^{-1} ST; a solubilização foi aumentada para 101% quando se aplicou 48 MJ kg^{-1} ST; além disso, os autores concluíram que o maior tempo de exposição favoreceu a solubilização da biomassa. Outros autores relataram que o aumento da produção de metano não foi maior do que 20% com a aplicação de energia abaixo de 75 MJ kg^{-1} ST, mas aumentou de 80-90% quando se aplicaram 100 - 200 MJ kg^{-1} ST (ALZATE et al. 2012; GONZALEZ-FERNANDEZ et al. 2012b).

Apesar de alguns estudos terem obtido aumento no rendimento de metano após a aplicação de ultrassom, o emprego de energia é relativamente alto em relação ao potencial energético que pode ser recuperado da biomassa algal.

As micro-ondas são uma energia eletromagnética de baixo comprimento de onda que varia na frequência de 0,3 a 300 GHz. Os fornos de micro-ondas doméstico e comercial operam, geralmente, a 2,45 GHz. As ondas aumentam a energia cinética das moléculas de água, levando ao estado de ebulição. A energia aplicada pelas micro-ondas não é capaz de quebrar ligações químicas, mas pode romper ligações de hidrogênio (Passos et al. 2014c).

Dessa forma, assim como para o ultrassom, a potência e o tempo de exposição influenciam a eficiência do pré-tratamento, assim como a temperatura e a concentração da biomassa (KIM et al. 2013).

Passos et al. (2013a) trataram biomassa de microalgas por micro-ondas e os resultados obtidos apontaram um aumento na solubilização da biomassa e rendimento de metano proporcional à energia específica aplicada. Os testes de PBM mostraram melhores resultados

quando se aplicou 65,4 MJ/kg ST, alcançando 8% de solubilização e um aumento de 78% no rendimento de metano.

Em outro estudo, em condições contínuas, o rendimento aumentou em 30% e 58% operando com TDH de 15 e 20 dias, respectivamente. Apesar da melhoria no rendimento de metano e na solubilização da biomassa, os autores observaram que o balanço energético não foi positivo, consumindo mais energia do que produzindo (PASSOS et al. 2014b).

3.3.3 Pré-tratamentos químicos

Neste tipo de pré-tratamento utiliza-se a capacidade de reagentes ácidos e alcalinos solubilizarem a hemicelulose e a lignina presentes nas biomassas. Indica-se o pré-tratamento ácido como mais efetivo para a solubilização da hemicelulose e o alcalino para a da lignina (RODRIGUEZ et al. 2015, BOHUTSKI e BOUWER, 2013; MENDEZ et al. 2013).

Bohutskyi et al. (2014) aplicaram o pré-tratamento alcalino a cinco espécies de microalgas (*Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira weissflogii*, *Tetraselmis* sp. e *Pavlova_cf* sp.) a diferentes concentrações de NaOH. O efeito observado foi negligenciável. Contudo, a combinação do tratamento alcalino com alta temperatura resultou em um aumento de 30 - 40% no rendimento de metano para *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp., mas não teve efeito nas outras espécies. Os custos com a adição de um reagente químico e com o aquecimento inviabilizam o tratamento para emprego em escala real.

3.3.4 Pré-tratamentos biológicos

O emprego de técnicas de pré-tratamentos térmicos, mecânicos e químicos tornam-se dispendiosos, na maioria das vezes, uma vez que a energia requerida não é compensada na produção de metano. O pré-tratamento biológico se destaca como uma alternativa atraente, utilizando-se de enzimas e micro-organismos para promover a hidrólise da biomassa de microalgas.

As celulasas, enzimas capazes de hidrolisar a celulose, podem ser produzidas por microrganismos como fungos, bactérias e protozoários. Espécies de *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. estão entre os fungos mais bem conhecidos pelo potencial celulolítico (TAMBOLI et al. 2017).

A produção comercial de celulase é realizada usando diferentes cepas fúngicas na produção de enzimas celulolíticas (exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase), via

fermentação submersa. Esse tipo de fermentação ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis (SRIVASTAVA et al. 2018).

A hidrólise enzimática da biomassa celulósica, em açúcares, requer a ação sinérgica da endoglucanase, exoglucanase (divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs)) e β -glicosidase (responsáveis pela liberação da celobiose). As endoglucanases são responsáveis pela hidrólise da estrutura da celulose, e pela rápida solubilização do polímero celulósico, enquanto as celobiohidrolases são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose. Posteriormente, as β -glucosidases cortam a celobiose para liberar moléculas de glicose. Estes três passos levam ao processo de hidrólise. Além disso, durante a reação de hidrólise, as endoglucanases atuam na região amorfa, que é mais solúvel na estrutura da celulose, enquanto as celobiohidrolases são ativas para clivar ligações β -1,4-glicosídicas das extremidades da cadeia, para liberar oligossacarídeos. Portanto, a endoglucanase desempenha um papel ativo na transformação da estrutura sólida da celulose em açúcares, enquanto a exoglucanase é responsável pela sua solubilização (SRIVASTAVA et al. 2018).

O pré-tratamento enzimático se destaca por não envolver compostos inibitórios, como no caso da aplicação de reagentes químicos. Neste caso, os fatores que influenciam o tratamento são as dosagens de enzimas, temperatura do processo e tempo de exposição. No entanto, deve-se levar em consideração a lentidão do processo biológico e a alta seletividade das enzimas, os custos de produção de enzimas e o espaço requerido para o processo em grande escala. Além disso, a eficiência irá depender das espécies de microalgas e a diversidade de composição das paredes celulares (BOHUTSKYI e BOUWER, 2013; PASSOS et al. 2014c).

Os pré-tratamentos enzimáticos baseiam-se na utilização de extratos enzimáticos de diferentes origens. No pré-tratamento por enzimas comerciais exógenas, as microalgas são expostas a preparações enzimáticas de composição definida, enquanto que, o pré-tratamento por enzimas endógenas consiste no uso de micro-organismos ou extratos enzimáticos brutos (CÓRDOVA et al. 2018).

Cinco diferentes enzimas (α -amilase, protease, lipase, xilanase e celulase) foram utilizadas para o pré-tratamento da biomassa de *Rhizoclonium*, aplicando uma dose de enzimas de 1% (m/m). A maior produção (145 mL CH₄ g⁻¹ ST) foi obtida utilizando uma mistura de enzimas (20% de cada enzima). Por outro lado, menores rendimentos de metano foram obtidos quando se utilizou, separadamente, lipase, xilalase, amilase, protease e celulase (115, 118, 121, 116 e 133 mL de CH₄ g⁻¹ ST, respectivamente). O rendimento de metano

obtido pela mistura de enzimas foi 31% e 21% maior do que o de amostras submetidas ao pré-tratamento com moagem em liquidificador e por sonicação, respectivamente (EHIMEN et al. 2013).

Uma crescente atenção tem sido dada ao uso de extrato enzimático produzido por fungos, como por exemplo, *Aspergillus lentulus*, para a hidrólise da parede celular de microalgas (PRAJAPATI et al. 2015b).

O aumento na produção de biogás obtido pela aplicação de um pré-tratamento enzimático à biomassa de microalgas (predominante por *Oocystis* sp.), foi avaliado com dois tipos de pré-tratamentos, usando a mesma enzima (de origem diferente). O primeiro usando a enzima lacase comercial e o segundo usando enzima fúngica bruta de *Trametes versicolor* a uma dose de 100 U/L. O pré-tratamento com a lacase comercial aumentou o rendimento de metano em 20%, enquanto o pré-tratamento com a enzima fúngica, aumentou a produção de metano em 74% em relação à biomassa não tratada. Essa diferença foi atribuída à presença de outras enzimas, radicais e outros mediadores produzidos por *T. versicolor* na cultura, alcançando uma maior solubilização das células. Portanto, é possível inferir que a eficácia na degradação da parede celular é maior com extratos enzimáticos brutos, pelo efeito sinérgico de outros componentes celulares (HOM-DIAZ et al. 2016).

3.3.5 Comparação entre os métodos de pré-tratamento

Conforme foi discutido, existem diferentes métodos de pré-tratamento aplicados às microalgas. Alguns deles podem envolver elevada demanda energética, que muitas vezes pode não ser compensada. Na maioria dos pré-tratamentos térmicos e mecânicos aplicados à biomassa de microalgas, o consumo de energia é igual ou superior à energia adquirida a partir da célula das microalgas. Desta forma, é necessário avaliar e balancear os custos e retorno energético, que irão variar de acordo com as espécies de microalgas e condições aplicadas ao processo (WARD et al. 2014).

Os pré-tratamentos térmico, hidrotérmico, ultrassom e micro-ondas foram comparados em termo de solubilização da biomassa de microalgas e produção de metano através de testes de PBM (PASSOS et al. 2015a). A solubilização da matéria orgânica foi muito mais elevada para o pré-tratamento térmico quando comparado com os demais tipos. Para todos os pré-tratamentos, com exceção do hidrotérmico, as principais macromoléculas solubilizadas foram proteínas e carboidratos, sendo encontrada uma correlação positiva entre a solubilização da matéria orgânica e o aumento na produção de metano, que foi significativamente maior após o

pré-tratamento térmico (72%), seguido por hidrotérmico (28%) e micro-ondas (21%), enquanto que o ultrassom não apresentou melhora significativa em comparação com a biomassa sem pré-tratamento. De modo geral, o pré-tratamento térmico (95 °C, 10 h) apresentou resultados mais eficientes.

3.4 Outros métodos para aumentar o rendimento de metano

Para que haja uma produção viável e sustentável de biocombustível a partir da biomassa de microalgas outros métodos como biorrefinarias e co-digestão podem ser utilizados para aumentar o rendimento de metano.

3.4.1 Biorrefinaria

A biorrefinaria à base de microalgas pode contribuir para sistemas de produção de biocombustíveis econômicos e mais sustentáveis, desenvolvendo tecnologias de produção de bioenergia e bioprodutos (incluindo os combustíveis, produtos químicos e até mesmo alimentos ou ração animal). O principal objetivo é de transformar biomassa em biocombustíveis e produtos de alto valor agregado (TRIVEDI et al. 2015). No entanto, estudos recentes sobre microalgas, confirmaram, com base em análise de custos, que são necessárias melhorias em quase todas as áreas da biorrefinaria, incluindo os métodos de cultivo, colheita, extração e conversão (LAURENS et al. 2017; RAHEEM et al. 2018).

A utilização das microalgas na biorrefinaria é possível se houver uma redução nos custos do processo de forma global. Dessa forma, apresentar melhorias nas várias etapas de produção de biomassa é de suma importância. Por sua ampla adaptabilidade a ambientes diversos (desde água doce, água do mar, até águas residuais), assim como pela capacidade de converter nitratos, fosfatos e sulfatos, as microalgas são uma matéria-prima atrativa (MAHDY et al. 2015; JEAN-MAXIME ROUX et al. 2017).

A biomassa derivada de microalgas pode ser convertida em biocombustíveis através de duas vias principais: i) as tecnologias de conversão termoquímica, que utilizam o calor e catalisadores para converter a biomassa em produtos intermediários, posteriormente convertidos em biocombustíveis por meio de rotas químicas e biológicas e; ii) o processo de conversão bioquímica, que compreende a utilização de micro-organismos ou enzimas para a hidrólise da biomassa pré-tratada para obter açúcares fermentáveis (RAHEEM et al 2018). O processamento bioquímico da biomassa para biocombustíveis é considerado menos intensivo

em energia, com alta seletividade, no entanto apresenta custos elevados. A produção *in situ* de enzimas poderia ser usada como uma alternativa mais rentável (CERVANTES et al. 2017; RAHEEM et al. 2018; SRIVASTAVA et al. 2018).

O desenvolvimento de processos de conversão adequados é um dos principais desafios da produção de biocombustíveis, onde as tecnologias dos processos existentes não utilizam todo o potencial energético destes micro-organismos. A integralização da digestão anaeróbia em uma biorrefinaria gera energia na forma de metano, além de tratar águas residuais e resíduos orgânicos, promovendo uma viabilidade econômica e sustentável ao processo (POLAKOVIČOVÁ et al. 2012; JANKOUSKA et al. 2017). Mussnug et al. (2010) apresentou um exemplo de biorrefinaria, onde o rendimento de biogás aumentou em 123% através da digestão anaeróbia de biomassa de algas, após a produção de hidrogênio. Ramos-Suárez e Carreras (2014) indicaram que a produção de metano a partir dos resíduos de *Scenedesmus* sp. após a extração de aminoácidos e lipídios foi maior que a da biomassa *in natura*, (272,8 L CH₄/kg SV; 212,3 L CH₄/kg SV e 140,3 L CH₄/kg SV, respectivamente).

Assim, uma produção viável e sustentável de biocombustível a partir da biomassa de microalgas é possível se houver uma abordagem de biorrefinaria, que possibilita a produção de biocombustíveis gasosos, assim como outros produtos que agregam valor econômico a partir da biomassa algal (CARRILLO-REYES e BUITRÓN, 2016).

3.4.2 Co-digestão

A digestão anaeróbia com apenas um substrato carrega as desvantagens de algumas propriedades desse substrato. Como por exemplo, elevadas concentrações de nitrogênio e baixas taxas para carga orgânica que inibem a metanogênese ou elevadas concentrações de metais pesados. Uma das formas de mitigar o efeito causado pela presença de apenas um substrato e aumentar a produção de metano na digestão anaeróbia, é a inserção de outras fontes de matéria orgânica no meio, processo denominado co-digestão (MATA-ALVAREZ et al. 2014).

Estudos recentes sobre co-digestão associaram microalgas a outros substratos como esterco bovino e suíno (ATALS et al. 2015), óleos e graxas (PARK e LI, 2012) resíduos de lodos ativados (WANG e PARK, 2015) e palha de milho (ZHONG et al. 2013). Entretanto, a elevada degradabilidade de resíduos alimentares os tornam importantes coadjuvantes no processo de degradação anaeróbia (NAGAO et al. 2012).

Jason (2015) e Kim e Kang (2015) apresentaram resultados positivos na associação de microalgas e resíduos alimentares, a partir do estudo cinético para a produção de metano e da análise do efeito sinérgico que as características de cada co-substrato causa no outro. Corroborando com esses autores, Zhen et al. (2016) obtiveram valores para a produção de metano cerca de seis vezes o valor da produção desse gás sem a adição do co-substrato, utilizando a razão 0,2:0,8 (Microalga:Resíduo alimentar).

Um dos fatores que leva à escolha do melhor co-substrato para as microalgas deve ser a alta relação carbono/nitrogênio, com o intuito de minimizar os efeitos inibitórios da amônia remanescente na digestão anaeróbia (VARGAS et al. 2016). Além disso, como as outras formas de misturas também apresentam bom desempenho, o custo de transporte do co-substrato da fonte de geração até o local a ser utilizado também deve ser levado em consideração, bem como outros fatores.

A adição de glicerol (preço baixo e co-produto de produção de biodiesel, facilmente disponível) à biomassa residual de *Chlorella* sp. após extração de lípidos aumentou, moderadamente, a produção de metano de 4% para 7% (EHIMEN et al. 2009). Foi comprovado que, a adição de glicerol à biomassa de microalgas foi favorável para a relação carbono/nitrogênio ($C/N = 12,4$) e, conseqüentemente, para a produção de metano (aumento de 50%) (EHIMEN et al. 2011).

Outro fator que apresenta vantagens econômicas e ecológicas é a co-digestão da biomassa de microalgas e resíduos de lodos ativados. As microalgas podem crescer em ambientes ricos em nutrientes, como águas residuais e, simultaneamente, podem utilizar carbono orgânico e fósforo inorgânico, nitrogênio e metais. Desse modo, os custos do tratamento de águas residuais e os custos do cultivo de algas podem diminuir (CÓRDOVA et al. 2018).

Uma visão sobre a digestão anaeróbia, em nível molecular, seria útil para padronizar o processo em relação à biomassa específica de microalgas e a vários substratos co-digeridos (WARD et al. 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em três fases experimentais, desenvolvidas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da UFPE, em Recife, Pernambuco, Brasil. Uma visão geral da pesquisa realizada está apresentada na Tabela 3. A digestão anaeróbia foi realizada com resíduos, após extração lipídica (Experimento 1). Devido à possível toxicidade desses resíduos, associada ao uso de solventes orgânicos, foi investigado o uso de biomassa pré-tratada, proveniente de nicho ecológico natural (Experimento 2). Diante dos estudos relacionados aos custos associados aos pré-tratamentos, foi utilizada biomassa de *Chlorella* sp. (adquirida comercialmente) pré-tratada biologicamente (Experimento 3). Os procedimentos metodológicos a seguir foram comuns às três fases experimentais.

Tabela 3 - Visão geral do objetivo, substrato e pré-tratamento para cada fase experimental.

Objetivo	Substrato	Pré-tratamento	Experimentos
Investigar o potencial de produção de metano da biomassa residual de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Desmodesmus subpicatus</i> após extração lipídica.	Resíduos de microalgas	Extração de lipídios	1
Avaliar o potencial de produção de metano a partir da digestão anaeróbia da biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos, submetida à técnica de pré-tratamento para hidrólise celular.	Consórcio de micro-organismos fotossintéticos	Ultrassom Micro-ondas Hidrotérmico	2
Avaliar o potencial de produção de metano da biomassa de <i>Chlorella</i> sp. submetida à pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de micro-organismos fúngicos.	<i>Chlorella</i> sp.	Biológico (Enzimas endógenas)	3

Fonte: A autora (2019)

4.1 Inóculo

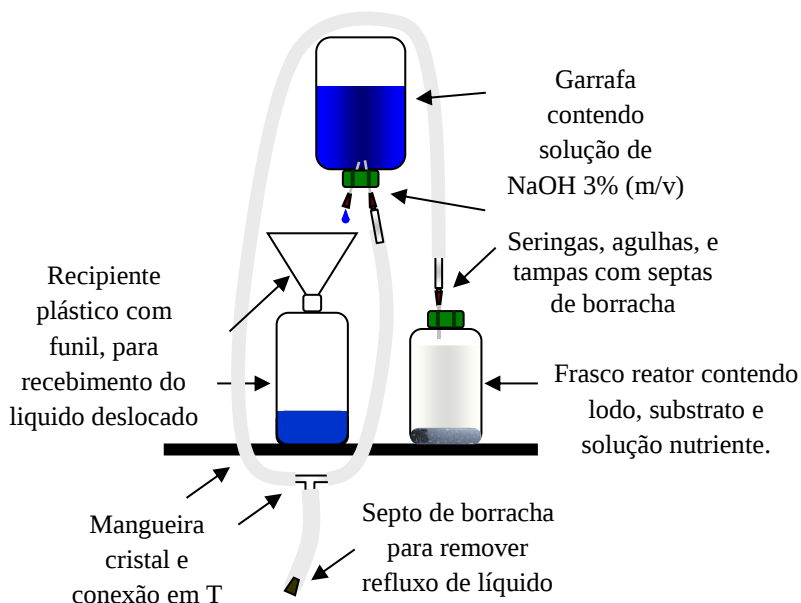
O inóculo granular utilizado como consórcio microbiano foi proveniente de um reator anaeróbio de circulação interna (IC) operando em uma indústria de cervejaria. A caracterização do inóculo consistiu na quantificação do teor de sólidos totais (48 ± 4 g ST/L) e sólidos totais voláteis (42 ± 4 g STV/L) presentes na amostra. O lodo permaneceu armazenado em geladeira a 4°C até a sua utilização nos experimentos. Para definir a

capacidade máxima de produção de metano pelo inóculo foi realizado o teste de Atividade Metanogênica Específica (AME), descrito por Aquino et al. (2007). O teste de AME é realizado adicionando-se ao reator o inóculo (lodo), solução nutriente e uma solução substrato de fácil degradação, que geralmente é constituída por um mistura de ácidos graxos voláteis (AGV), constituída por acetato, propionato e butirato na proporção de 1:1:1 g/L (AQUINO et al., 2007). A velocidade e volume de produção de metano correspondem à degradação completa do substrato e à atividade do lodo. A atividade metanogênica deste lodo foi de 0,189 g DQO-CH₄/ g STV. d. O item 4.2 explica os princípios de funcionamento do teste. As condições experimentais do teste de potencial bioquímico de metano (PBM) foram iguais às dos experimentos de AME, modificando o substrato.

4.2 Testes de Atividade Metanogênica Específica (AME) e de Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

Os testes foram conduzidos em frascos reatores (Figura 4) com um headspace entre 10% - 20%, em triplicata e incubados em sala termostatzada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$).

Figura 4 - Figura esquemática do aparato utilizado para os testes de AME e PBM.



Fonte: Adaptado de Aquino et al. (2007)

O volume de metano produzido foi medido, diariamente, a partir do deslocamento da solução de hidróxido de sódio (NaOH - 3% m/v) de uma garrafa de soro invertida, conectada ao reator através de mangueira cristal transparente. O volume deslocado de NaOH,

corresponde ao metano (CH_4) produzido (mL), medido por gravimetria. Para quantificar a produção de metano pela respiração endógena foram preparados reatores apenas com o inóculo. Também foram preparados controles positivos, contendo apenas o substrato. Todos os reatores foram purgados, durante 1 min, com gás nitrogênio, visando eliminar o oxigênio presente, garantindo a condição anaeróbia no reator.

4.3 Solução nutriente

A solução nutriente utilizada nos experimentos é composta da mistura de duas soluções: macronutrientes e micronutrientes. No momento da utilização das soluções, 1 mL da solução de micronutrientes deve ser adicionado por litro da solução de macronutrientes. Na Tabela 4 encontra-se a concentração e a composição de cada substância utilizada nas soluções.

Tabela 4 - Concentração dos reagentes para preparação das soluções nutrientes

Solução	Reagente	Concentração (g/L)
Macronutrientes	NH_4Cl	0,280
	K_2HPO_4	0,252
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,100
	CaCl_2	0,007
	NaHCO_3	0,400
	Extrato de levedura	0,100
Micronutrientes	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,000
	ZnCl_2	0,050
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,500
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,142
	$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,164
	H_3BO_3	0,050
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,038
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,000
	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,090
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,050
	EDTA	1,000
	Resazurina	0,200
	HCl	1,000 (mL/L)

Fonte: Florencio, 1993

4.4 Métodos analíticos

As análises físico-químicas foram realizadas conforme métodos analíticos do *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012) conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis e métodos analíticos utilizados na caracterização da biomassa

Variáveis	Métodos
pH	Eletrométrico
Temperatura (°C)	Eletrométrico
Alcalinidade total e parcial	Titulométrico (2320 B)
Demanda Química de Oxigênio (mg/L)	Colorimétrico (5220 D)
Nitrogênio total (mg/L)	Titulométrico (4500-NTK B)
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	Titulométrico (4500-NH ₃ C)
Fósforo total (mg/L)	Colorimétrico (4500-P C)
Ortofosfato (mg/L)	Colorimétrico (4500-P C)
Série de sólidos (mg/L)	Gravimétrico (2540 B.; D.; E)

Fonte: A autora (2019)

Quanto à caracterização macromolecular das biomassas utilizadas, o teor de lipídios totais foi determinado pelo o método adaptado de Bligh e Dyer (1959), utilizando o equipamento Soxhlet. Posteriormente ao processo, a fração lipídica foi removida, armazenada a 105 °C por 24h e determinada por gravimetria. O teor de proteína foi calculado usando um fator de conversão NTK/proteína de 5,95 (López et al., 2010). As composições de proteínas e lipídios foram calculadas como a porcentagem em termos do conteúdo total de sólidos voláteis da biomassa utilizada. O teor de carboidratos foi calculado como a diferença entre lipídios e proteínas (SURESH et al, 2013).

4.5 Biodegradabilidade anaeróbia

A biodegradabilidade anaeróbia (%) dos substratos analisados foi determinada a partir do volume líquido de metano (mL) e do rendimento teórico (350 mL CH₄/g DQO removida), sobre a DQO inicial de testes conduzido (PASSOS, et al. 2013a).

$$\text{Biodegradabilidade (\%)} = \left[\frac{(\text{CH}_4 \text{ (mL)}) / 350 \text{ (mL CH}_4\text{/gDQO removida)}}{\text{/gDQO inicial}} \right] \quad (\text{Equação 1})$$

4.6 Parâmetros cinéticos e tratamento estatístico dos dados

Os parâmetros cinéticos foram avaliados nas triplicatas dos reatores através do software OriginPro® 9. O potencial máximo de produção de metano (B_0), a taxa de produção de metano (K) e a duração da fase de lag (λ) foram determinados a partir do modelo de regressão de Gompertz (FAVARO et al, 2013), indicado na Equação 2:

$$B(t) = B_0 \exp \left\{ - \exp \left[k e \left(\frac{\lambda - t}{B_0} + 1 \right) \right] \right\} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

$B(t)$ é a produção acumulativa de metano no tempo t (d) (mL/g DQO);

B_0 é a produção máxima de metano (mL/g DQO);

k é a taxa de produção de metano (mL/d g DQO);

λ é o tempo de latência (d); e

e constante adimensional de Euler (2,718).

Para o tratamento estatístico dos dados foi aplicado programa statistica 9.0. Para estatística descritiva foram utilizadas as médias e as variâncias entre os dados obtidos.

4.7 Experimento 1 - Biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus* submetidas à extração lipídica

4.7.1 Cultivo

A biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus* utilizadas no presente estudo foi obtida através de crescimento fototrófico. Frascos de vidro transparente (20L) foram utilizados como fotobiorreatores para o cultivo, incubados sob iluminação artificial fluorescente constante, taxa de 40 W ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e bombeamento de ar de modo a promover a constante mistura do cultivo. As células das microalgas foram inoculadas (10% do volume total do cultivo) com adição de 1 mL/L de meio de cultivo Provazzoler adaptado (PROVASOLI, 1958) (Tabela 6).

Tabela 6 - Composição do meio comercial Provazzoli® com vitaminas do complexo B

Composição	Concentração
Meio comercial Provazzoli®	
H ₃ BO ₃	1,93 g/L
FeCl ₃	0,053 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	0,273 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0367 g/L
COSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g/L
Solução de EDTA 0,5 M	11,4 mL
Solução de vitaminas do complexo B	
Biotina (B7)	0,01 mL/L
Cianocobalamina (B12)	0,01 mL/L

Fonte: Adaptado de Provasoli (1958)

Para promover o crescimento e ganho de biomassa, o cultivo foi aumentado gradativamente. Para realização desta replicagem gradativa foi utilizada água de abastecimento tratada com cloro. Após adição do cloro no volume de água desejado, para que fosse acelerada a volatilização do reagente na solução, aerou-se com bombas de aquário por um tempo médio de 1 hora. Para aferir a concentração de ClO₂ (dióxido de cloro) na solução, utilizou-se o indicador de CH₃C₆H₄NH₂ (Orto-toluidina). A concentração da biomassa de microalgas foi realizada através da aplicação do método de decantação em cones *Imhoff* de vidro com volumes de 1L, sem adição de flocculantes. Posteriormente, a biomassa foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos (Centrífuga Thermo Electron Led GMBH, modelo Megafuse 16) e armazenada a 4 °C até à sua utilização.

4.7.2 Extração de lipídios totais

O primeiro passo realizado, antes do processo de extração dos lipídios totais, foi a liofilização das biomassas de *C. vulgaris* e *D. subspicatus*. O processo de liofilização foi realizado no liofilizador SP Scientific - Advantage Pro, a -54°C e pressão 0,1 mbar. A mesma quantidade de biomassa seca (3g) foi determinada para ambas as espécies. Esse método foi necessário visto a dificuldade encontrada em pré-testes anteriores para realizar a extração de lipídio com biomassa úmida.

Os lipídios foram extraídos utilizando um aparelho de Soxhlet, empregando o método adaptado de Bligh e Dyer (1959), perfazendo um total de 12 ciclos (em média, 8 horas) para

cada uma das diferentes misturas de solventes utilizadas: clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e etanol-hexano (2,5:1 v/v). Após a extração, o teor de lipídio foi determinado e as biomassas residuais foram lavadas e ressuspensas em água destilada para caracterização.

4.7.3 Teste do Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

A descrição dos reatores, de acordo com o substrato, está apresentada na Tabela 6. Os testes PBM foram realizados em frascos reatores de 250 mL, em triplicata, com headspace de 10%. A relação substrato/inóculo utilizada foi de 0,5 g DQO biomassa/ 1,0 g SV inóculo (CHO, et al. 2005). A concentração inicial do substrato foi 2 g DQO/L.

Tabela 7 - Descrição dos reatores (substratos) submetidos ao teste do PBM no experimento 1

Reator	Descrição/Substrato
C-IN	Biomassa <i>in natura</i> de <i>C. vulgaris</i>
CR-CM	Biomassa residual de <i>C. vulgaris</i> por clorofórmio-metanol
CR-EH	Biomassa residual de <i>C. vulgaris</i> por etanol-hexano
D-IN	Biomassa <i>in natura</i> de <i>D. subspicatus</i>
DR-CM	Biomassa residual de <i>D. subspicatus</i> por clorofórmio-metanol
DR-EH	Biomassa residual de <i>D. subspicatus</i> por etanol-hexano

Fonte: A autora (2019)

4.8 Experimento 2 - Biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos submetida a pré-tratamento para hidrólise celular

4.8.1 Substrato

A biomassa utilizada como substrato foi um consórcio de micro-organismos fotossintéticos de nicho ecológico natural, coletado no Açude de Apipucos, Recife-PE, identificado com alto nível de eutrofização. A coleta foi realizada em rede de nylon de plâncton com abertura de 20 µm. As amostras foram concentradas, em laboratório, através do método de centrifugação, a 3000 rpm por 15 minutos, lavadas e ressuspensas em água deionizada.

A identificação dos gêneros dominantes foi realizada em microscópio óptico binocular (Leica-DME), com amostras preservadas com lugol acético, usadas exclusivamente para analisar as características citomorfológicas (BICUDO e MENEZES, 2005). Para contagem

das células fitoplanctônicas foi utilizado o método de Utermöhl (1958), usando microscópio invertido Feldmann Wild Leitz, modelo Invert 1500, com contraste de fase.

4.8.2 Pré-tratamento e teor de solubilização (%)

Diferentes condições de hidrólise foram testadas, em três tipos de pré-tratamentos: por ultrassom (marca Unique, modelo USC-1850 A, 25 KHz, 120W), por micro-ondas (marca Brastemp, modelo Maxi Gratine BMX35AR, 60 Hz, 900W) e tratamento hidrotérmico utilizando autoclave (marca Phoenix, modelo vertical, pressão máxima de 3Kgf/cm²). As condições testadas foram selecionadas tomando como base os trabalhos realizados por Mendez, et al. (2014), Ometto, et al. (2014), e Passos e Ferrer, (2015). Realizou-se um planejamento estatístico fatorial de ordem 2², considerando duas variáveis e dois níveis, superior (+) e inferior (-), com triplicata em cada experimento. Os resultados das variáveis estudadas foram analisados com base no teor de solubilização (%) da amostra.

Os testes, para o pré-tratamento por ultrassom, foram realizados em tubos falcon (50 mL), utilizando 30 mL de suspensão de biomassa concentrada. No pré-tratamento por micro-ondas, foi utilizado 50 mL da suspensão, em frascos de vidro (100 mL). O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em frascos em vidro borosilicato com volume total de 100 mL, utilizando 50 mL de suspensão de biomassa concentrada. As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam as variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial para o pré-tratamento utilizando ultrassom, micro-ondas e autoclave, respectivamente.

Tabela 8 - Variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial 2² para o pré-tratamento por ultrassom

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Temperatura (°C)	30	80
Tempo (min)	10	30

Fonte: A autora (2019)

Tabela 9 - Variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial 2² para o pré-tratamento por micro-ondas

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Potência (W)	300	900
Tempo (min)	1	9

Fonte: A autora (2019)

Tabela 10 - Variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial 2² para o pré-tratamento hidrotérmico.

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Temperatura (°C)	100	120
Tempo (min)	10	30

Fonte: A autora (2019)

O grau de solubilização (%) foi calculado conforme a Equação (3), onde a DQOs corresponde a concentração de DQO solúvel após o pré-tratamento, a DQOs₍₀₎ corresponde a concentração de DQO solúvel na biomassa *in natura* e a DQOt corresponde a concentração de DQO total da biomassa *in natura* (ALZATE et al. 2012).

$$S (\%) = \frac{(DQOs - DQOs_0)}{(DQOt - DQOs_0)} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A energia aplicada (E), em MJ/kg ST, é função da potência (P), do tempo de exposição (t), do volume da amostra (V) e da concentração inicial de DQO e é calculada de acordo com a equação 4 (ALZATE et al. 2012). Essa condição foi calculada apenas para os pré-tratamentos por ultrassom e micro-ondas.

$$E = \frac{P \times t}{V \times DQO} \quad (\text{Equação 4})$$

4.8.3 Teste do Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

A condição ótima de pré-tratamento foi, posteriormente, utilizada nos testes do Potencial Bioquímico de Metano (PBM). Os testes foram conduzidos em frascos reatores de 500 mL, com headspace de 10%, em triplicata. O efeito da adição da solução de nutrientes na digestão anaeróbia foi avaliado para comprovar se a biomassa mista utilizada contém quantidades suficientes de nutrientes para a metabolização pelo inóculo. Dessa forma, os substratos testados foram: biomassa *in natura* (IN); biomassa *in natura* + nutrientes (INN); biomassa pré-tratada (PT); biomassa pré-tratada + nutrientes (PTN). A relação substrato/inóculo utilizada foi de 0,5 g DQO biomassa/ 1,0 g SV inóculo (CHO, et al. 2005) com concentração de 1 g DQO/L.

4.9 Experimento 3 - Biomassa de *Chlorella* sp. submetida à pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de fungos filamentosos

4.9.1 Substrato

A biomassa da microalga *Chlorella* sp. (adquirida comercialmente) foi utilizada como substrato para produção celulase e, conseqüentemente, submetido ao pré-tratamento biológico por enzimas endógenas. Como a celulose é o principal polímero que compõe a parede celular desta microalga, compreendendo cerca de 70-80% da massa seca (ABOSHADY et al. 1993), as enzimas do complexo celulolítico foram definidas para os testes.

4.9.2 Micro-organismos

Duas cepas de fungos filamentosos, *Trichoderma aureoviride* (URM 5574) e *Aspergillus niger* (URM 4645), obtidos da Coleção de Culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da UFPE foram selecionadas para a produção de celulasas atuando no pré-tratamento biológico. Os micro-organismos foram cultivados em tubos de ensaio, em meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) durante 7 dias a 28 °C.

4.9.3 Preparo do inóculo

Os fungos micro-organismos foram coletados dos tubos de ensaio e inoculados em placas de Petri contendo meio ágar malte e incubados em estufa, por 7 dias a 30 °C. A manipulação dos micro-organismos foi realizada em câmara de fluxo laminar (modelo PA 410) em condições estéreis. Todos os materiais, meios de cultura e soluções utilizados para o cultivo dos fungos foram previamente esterilizados em autoclave. A preparação do inóculo ocorreu através da adição de uma solução estéril de Tween 80 (0,1 % v/v) à placa contendo os esporos, posteriormente raspados com o auxílio de uma alça bacteriológica e transferidos para um Erlenmeyer (125 mL). A concentração de esporos presentes na suspensão foi determinada em câmara de *Neubauer*, sendo requerida uma concentração igual a 1×10^7 esporos/mL para inoculação no meio de produção de celulasas e pré-tratamento biológico (NCUBE et al. 2012).

4.9.4 Meio de cultura e produção celulolítica

Para produção celulolítica, realizada por fermentação submersa, foi empregada como meio de cultura o efluente anaeróbio da ETE Mangueira, Recife-PE, suplementado de acordo com Libardi et al. (2017): KH_2PO_4 (2,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) e peptona (5,0 g/L). O meio sintético de Mandels e Weber (1969), comumente utilizado, foi empregado como controle, para comparar e comprovar a produção celulolítica no meio efluente. O efluente foi caracterizado por meio do pH, DQO (total e solúvel), sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (mg/L) e fósforo (mg/L). O meio sintético foi constituído de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,4 g/L); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0037 g/L); KH_2PO_4 (2 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g/L); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,0016 g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,0014 g/L).

Os meios de cultura (120 mL), com pH ajustado a 5, previamente autoclavados a 120°C por 15 minutos, foram adicionados com os substratos indutores (biomassa *Chlorella* sp. e celulose microcristalina, 1,2g) em frascos erlenmeyer (250 mL). Posteriormente os frascos foram manipulados em câmara de fluxo laminar para adição da suspensão de esporos (10^7 esporos/mL). Para os testes foi utilizada incubadora shaker de agitação a 120 rpm, com controle de temperatura (30°C). O tempo de fermentação foi definido a partir de testes anteriores realizados por 7 dias, utilizando as mesmas condições descritas. Após a fermentação, os meios de cultivos foram filtrados em papel filtro e o extrato enzimático utilizado para a determinação da atividade celulolítica (U/L), sendo posteriormente congelado até sua utilização. O resíduo da biomassa de *Chlorella* sp., foi lavado e ressuspensão em água deionizada para sua utilização nos testes PBM.

4.9.5 Determinação da atividade celulolítica

As atividades celulolíticas FPase (exoglucanases + endoglucanases) e CMCase (endoglucanases) foram determinadas de acordo com o método proposto por Ghose (1987), utilizando o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

A atividade FPase (atividade de papel de filtro) foi determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro nº 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. Em tubos de ensaio, foi adicionada uma tira de papel, 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 (50mM), 0,5 mL de extrato celulolítico. No segundo tubo (controle) foi adicionando 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto que no terceiro tubo foi

adicionada uma tira de papel filtro e 1,5 mL de solução tampão. As amostras foram levadas a banho maria a 50 °C por uma hora e a reação foi interrompida com a adição de 3 mL DNS. Em seguida, os tubos foram conduzidos a 5 minutos em água fervente, adicionados 20 mL de água destilada e seguiram para medição de absorbância em de 540 nm.

Para a atividade de CMCase foi realizado com a dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC). Foram adicionados em tubo de ensaio: 0,5 mL de CMC, 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 (50 mM) e 0,5 mL de extrato enzimático. Em outro tubo (controle) foram adicionados 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL da mesma solução tampão. Para o branco foram adicionados 0,5 mL de solução tampão e 0,5 mL de DNS. As amostras foram levadas a banho maria a 50 °C por 10 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL DNS. Assim como na atividade FPase, os tubos foram conduzidos a 5 minutos em água fervente, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada e seguiram para medição de absorbância em de 540 nm.

O pré-tratamento da biomassa pela celulase foi determinado em termos de açúcar liberado ($\mu\text{mol/mL}$), convertido para atividade celulolítica (U/L). Dessa forma, o resíduo da espécie fúngica que apresentou maior atividade celulolítica foi selecionado para o teste PBM. A Tabela 11 descreve os tratamentos utilizados.

Tabela 11 - Descrição dos tratamentos utilizados para determinação da atividade celulolítica

Ensaio	Tratamentos	Descrição
1	AE1	<i>A. niger</i> + efluente anaeróbio + celulose
2	AE2	<i>A. niger</i> + efluente anaeróbio + <i>Chlorella</i> sp.
3	AM1	<i>A. niger</i> + meio sintético + celulose
4	AM2	<i>A. niger</i> + meio sinético + <i>Chlorella</i> sp.
5	TE1	<i>T. aureoviride</i> + efluente anaeróbio + celulose
6	TE2	<i>T. aureoviride</i> + efluente anaeróbio + <i>Chlorella</i> sp.
7	TM1	<i>T. aureoviride</i> + meio sintético + celulose
8	TM2	<i>T. aureoviride</i> + meio sintético + <i>Chlorella</i> sp.

Fonte: A autora (2019)

4.9.6 Teste do Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

Os testes foram conduzidos em frascos reatores de 250 mL, com headspace de 10%, em triplicata. A relação substrato/inóculo utilizada foi de 0,5 g DQO biomassa/ 1,0 g SV inóculo (CHO, et al. 2005), com concentração de 1 g DQO/L.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta subseção, primeiro estão apresentados os resultados e discussão sobre o uso da biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus* submetidas à extração lipídica (Experimento 1). Depois disso, serão apresentados os resultados do uso da biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos submetida pré-tratamento para hidrólise celular (Experimento 2) e por fim, serão apresentados os resultados referentes ao uso da biomassa de *Chlorella* sp. submetida à pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de micro-organismos fúngicos (Experimento 3).

5.1 Experimento 1 - Biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus* submetidas à extração lipídica

5.1.1 Caracterização das biomassas de microalgas *in natura* e residuais

As amostras residuais das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus*) utilizadas foram obtidas com base na extração de lipídio, através de dois tipos de misturas de solventes diferentes: clorofórmio-metanol (CM) e etanol-hexano (EH). As amostras, *in natura* e residuais de *C. vulgaris* são indicadas como C-IN, CR-CM, CR-EH, enquanto que *D. subspicatus* são indicadas como D-IN, DR-CM, DR-EH, respectivamente. A Tabela 12 apresenta os resultados da caracterização físico-química da biomassa *in natura* (C-IN) e residual (CR-CM e CR-EH) de *C. vulgaris*.

Tabela 12 - Caracterização da biomassa *in natura* e residual de *C. vulgaris* (C-IN) após extração com clorofórmio-metanol (CR-CM) e etanol-hexano (CR-EH). Média $\pm$ desvio padrão

Variáveis	C-IN	CR-CM	CR-EH
pH	6,1 $\pm$ 0,01	7,1 $\pm$ 0,10	6,8 $\pm$ 0,02
DQO total (mg/L)	30107 $\pm$ 805,04	16154 $\pm$ 911,39	16401 $\pm$ 751,61
DQO solúvel (mg/L)	654 $\pm$ 16,10	333 $\pm$ 21,82	173 $\pm$ 7,50
Nitrogênio total (mg/L)	393 $\pm$ 2,31	150 $\pm$ 6,13	124 $\pm$ 10,92
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	79 $\pm$ 3,27	26 $\pm$ 1,97	30 $\pm$ 1,60
Fósforo total (mg/L)	152 $\pm$ 6,03	82 $\pm$ 4,29	88 $\pm$ 3,10
Ortofosfato (mg/L)	5 $\pm$ 0,01	1 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,07
Sólidos totais (mg/L)	21833 $\pm$ 117,85	12833 $\pm$ 506,90	12606 $\pm$ 689,69
Sólidos totais voláteis (mg/L)	19333 $\pm$ 589,26	10806 $\pm$ 209,72	10745 $\pm$ 704,56

Fonte: A autora (2019)

Foi caracterizado um conteúdo orgânico (STV/ST) de 89%, 84% e 85% para C-IN, CR-CM e CR-EH, respectivamente. As biomassas apresentaram-se, em geral, na forma particulada, com baixa DQO solúvel, representando somente cerca de 2% (C-IN), 2% (CR-CM) e 1 % (CR-EH) da DQO total. Dessa forma, esses valores sugerem que apenas uma baixa fração da matéria orgânica estava prontamente disponível para degradação bacteriana.

A Tabela 13 apresenta os resultados da caracterização físico-química da biomassa *in natura* (D-IN) e residual (DR-CM e DR-EH) de *D. subspicatus*. Em relação ao conteúdo orgânico, *D. subspicatus* apresentou alta relação STV/ST (97, 93 e 95% para C-IN, CR-CM e CR-EH, respectivamente). Similarmente, a fração solúvel da matéria orgânica foi mais alta que no experimento com *C. vulgaris* (9, 4 e 23% para D-IN, DR-CM e DR-EH, respectivamente).

Tabela 13 - Caracterização da biomassa *in natura* e residual de *D. subspicatus* (D-IN) após extração com clorofórmio-metanol (DR-CM) e etanol-hexano (DR-EH). Média $\pm$ desvio padrão

Variáveis	D-IN	DR-CM	DR-EH
pH	6,6 $\pm$ 0,03	6,0 $\pm$ 0,10	6,0 $\pm$ 0,16
DQO total (mg/L)	32472 $\pm$ 402,52	10158 $\pm$ 839,56	16555 $\pm$ 880,58
DQO solúvel (mg/L)	2863 $\pm$ 16,10	431 $\pm$ 18,74	3792 $\pm$ 116,85
Nitrogênio total NTK (mg/L)	938 $\pm$ 64,58	543 $\pm$ 36,53	486 $\pm$ 40,41
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	86 $\pm$ 3,83	52 $\pm$ 2,94	51 $\pm$ 4,00
Fósforo total (mg/L)	164 $\pm$ 0,72	62 $\pm$ 3,70	67 $\pm$ 4,84
Ortofosfato (mg/L)	13 $\pm$ 0,15	2 $\pm$ 0,12	1 $\pm$ 0,06
Sólidos totais (mg/L)	19335 $\pm$ 233,35	6482 $\pm$ 517,53	7570 $\pm$ 412,43
Sólidos totais voláteis (mg/L)	18735 $\pm$ 190,92	5999 $\pm$ 486,63	7223 $\pm$ 448,81

Fonte: A autora (2019)

A composição macromolecular de *C. vulgaris* foi caracterizada por 11 % de proteína e 55% de carboidratos, enquanto que *D. subspicatus* apresentou valores de 29% e 32%, respectivamente. Os teores de lipídio para a biomassa de *C. vulgaris* e *D. subspicatus*, após extração por clorofórmio-metanol (CM) e etanol-hexano (EH) estão apresentados na tabela 14.

Tabela 6 - Média e desvio padrão dos níveis de lipídios extraídos por clorofórmio-metanol (CM) e etanol-hexano (EH).

Microalgas	Mistura de solventes	Lipídio (% ST)
<i>C. vulgaris</i>	CR-CM	26 $\pm$ 0,5
	CR-EH	19 $\pm$ 0,6
<i>D. subspicatus</i>	DR-CM	37 $\pm$ 0,2
	DR-EH	34 $\pm$ 0,5

Fonte: A autora (2019)

De acordo com Becker (2007), os teores de proteína, carboidratos e lipídios para *C. vulgaris* situam-se na faixa de 51-58%, 12-17% e 14-22%, respectivamente. Tomando como base espécies semelhantes à *D. subspicatus*, como *Scenedesmus* sp., os teores encontram-se na faixa de 50-56% para proteína, 10-17% para carboidrato e 12-14% para lipídios (BECKER, 2007). Ramos-Suárez e Carreras et al. (2014) relataram altos teores de proteínas (42,5%) e frações de 12,3% e 16,9% de carboidratos e lipídios, respectivamente, na biomassa de *Scenedesmus* sp., enquanto que, Chaudhary et al. (2017) constataram percentuais de lipídios variando de 29% a 31% para *Desmodesmus subspicatus* submetidos à diferentes condições de cultivo.

Em relação às espécies estudadas, *D. subspicatus* apresentou maiores teores de lipídios para as duas misturas de solventes utilizadas em comparação à *C. vulgaris*. Essa diferença é explicada, pela composição bioquímica das espécies e pelas condições promovidas durante o seu cultivo, como fatores ambientais, tais como temperatura, iluminação, pH, conteúdo mineral, densidade populacional, fase de crescimento, entre outros (TRIVEDI et al. 2015).

Ao observar os dados (Tabela 14), é possível constatar que a mistura clorofórmio-metanol foi mais eficiente, visto que o percentual de lipídios de *C. vulgaris* e *D. subspicatus* após extração por esta mistura apresentou maiores valores quando comparados aos da mistura de etanol-hexano. Isso se deve ao fato da mistura de clorofórmio-metanol possuir capacidade de extrair, eficientemente, tanto os lipídios neutros quanto lipídios polares, enquanto que as misturas de solvente utilizando hexano (apolar) não têm a mesma eficiência para extrair lipídios polares (HALIM et al. 2012). No entanto, é importante ressaltar que altos rendimentos de extração de constituintes celulares polares, como proteínas, pigmentos, carboidratos, fosfolipídios e glicolipídios, entre outros, também estão presentes no produto após a extração (HIDALGO et al. 2016).

Os resultados obtidos para C-CM ($26 \pm 0,5$ %) e D-CM ($37 \pm 0,2$ %) foram superiores aos descritos por Hidalgo et al. (2016), que testaram solventes não polares e polares, bem como suas misturas, para a extração de lipídios de *Botryococcus braunii*. O maior rendimento de extração de lipídios foi de 19,2% em peso (com base na biomassa seca) usando uma mistura de clorofórmio-metanol (75% v/v de metanol). Enquanto que Lee et al. (2010), aplicaram uma mistura de clorofórmio-metanol (1:1 v/v) para extração lipídica de *Botryococcus* sp. e Guldhe et al. (2014) usaram uma mistura de clorofórmio-etanol (1:1 v/v) para extração de lipídios de *Scenedesmus obliquus*, os rendimentos foram 29,65 e 28,1%,

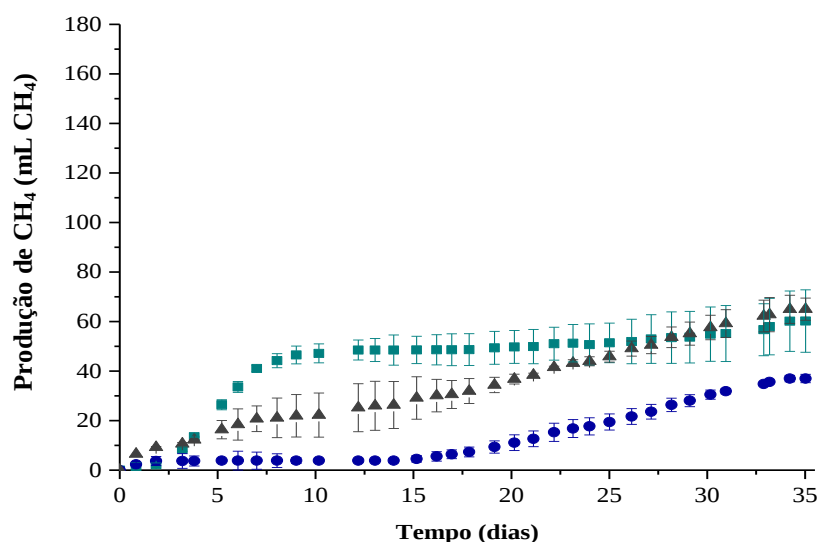
respectivamente. Valores inferiores (rendimento de 8,9%) foram encontrados por Sumprasit et al. (2017) ao utilizar o clorofórmio/metanol (2:1 v/v), na mesma proporção utilizada neste estudo, para extração de lipídios de *Spirulina platensis*.

Zhang e Ogden (2017) compararam dois métodos diferentes de extração de lipídios para *Chlorella sorokiniana*. Do primeiro (usando hexano em Soxhlet) foi obtido um rendimento de 4,8% de lipídios, enquanto que a extração com micro-ondas usando clorofórmio-metanol resultou em 25,4%. Esse último é comparável ao resultado encontrado nesse trabalho, com a mesma mistura de solventes, para o mesmo gênero de microalgas, porém com método de extração diferente. Conforme podem ser observados (Tabela 13), os demais resultados também apresentam valores superiores. Quando o hexano foi usado para extração de lipídios a partir de uma cultura mista (*Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp.), o rendimento foi de 24% (KERIS-SEN et al. 2014).

5.1.2 Teste do potencial bioquímico de metano (PBM)

A produção acumulada de metano para a biomassa de *C. vulgaris in natura* e para resíduos após extração de lipídios, durante o período de incubação de 35 dias, é mostrada na figura 5. A biomassa *in natura* (C-IN) apresentou um volume final de metano de $60 \pm 12,6$ mLCH₄. Para os resíduos (CR-CM e CR-EH) após extração, os valores foram de $37 \pm 1,7$ mLCH₄ e $65 \pm 4,5$ mLCH₄, respectivamente. Conforme pode ser observado, o resíduo CR-EH apresentou maior produção final de metano.

Figura 5 – Produção acumulada de CH₄ em testes de PBM utilizando biomassa de *C. vulgaris in natura*: C-IN (■) e residual após extração de lipídios: CR-CM (●); CR-EH (▲)

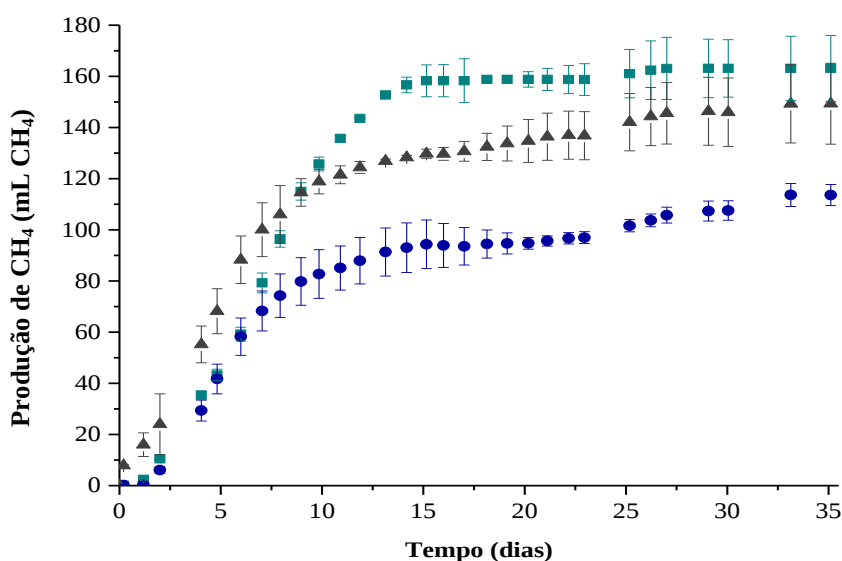


Fonte: A autora (2019)

No início do experimento, o volume de CH₄ da C-IN foi crescente nos primeiros 9 dias, apresentando rendimento máximo de $47 \pm 3,6$ mL CH₄/g DQO, representando 77% da produção de CH₄ final. O resíduo CR-CM apresentou fase lag de baixa produtividade de metano até 15 dias após iniciado o teste. Um longo período de latência, de mais de 18 dias, também foi observado por Yun et al. (2014), ao utilizar *C. vulgaris*.

Em comparação à *C. vulgaris*, a produção acumulada de metano para a biomassa de *D. subspicatus in natura* e os resíduos após extração de lipídios, durante o período de incubação de 35 dias (Figura 6) apresentou valores mais elevados. A biomassa *in natura* (D-IN) apresentou um volume final de metano superior aos resíduos (DR-CM e DR-EH) após extração, com valores de $163 \pm 12,9$ mLCH₄, $113,6 \pm 4,1$ mLCH₄ e $149,3 \pm 15,8$ mL CH₄, respectivamente.

Figura 6 - Produção acumulada de CH₄ em testes de PBM utilizando biomassa de *D. subspicatus in natura*: D-IN (■) e residual após extração de lipídios: DR-CM (●); DR-EH (▲).



Fonte: A autora (2019)

Contrário à biomassa C-CM, a D-CM apresentou fase lag mais rápida, com volume de CH₄ de 94,3 mL, equivalendo a 83% do volume final apresentado. De forma similar, a biomassa *in natura* e D-EH atingiram valores de 158,3 e 129,8 mL de CH₄, representando 97% e 97% do volume total.

Os resultados do volume acumulado de CH₄, produção específica e bioegradabilidade anaeróbia (%) estão apresentados na Tabela 15. Conforme pode ser observado, os resíduos após extração com a mistura de solventes etanol-hexano apresentaram maior produção específica de CH₄ em relação aos resíduos após extração por clorofórmio-metanol. Em

relação à biodegradabilidade anaeróbia, *D. subspicatus* apresentou maior biodegradabilidade anaeróbia em relação à *C. vulgaris*.

A espécie *D. subspicatus* apresentou elevadas produções de CH₄, em comparação a *C. vulgaris*. A biomassa D-EH apresentou maior produção específica de metano entre as condições estudadas, com $293,32 \pm 20,2$ mLCH₄/g DQO. De forma geral, o uso das mistura de solvente composta por etanol-hexano, na etapa da extração de lipídios, apresentou um efeito positivo importante no rendimento de CH₄.

Tabela 15 - Produção acumulada de (mLCH₄), produção específica (mLCH₄/g DQO) e biodegradabilidade anaeróbia (%) para as condições testadas nos testes de PBM

Espécie	Reatores	Volume acumulado de CH ₄ (mL CH ₄)	Produção específica (mLCH ₄ /g DQO)	Biodegradabilidade anaeróbia (%)
<i>C. vulgaris</i>	C-IN	$60,2 \pm 12,6$	$109,5 \pm 23,3$	9
	C-CM	$37,0 \pm 1,7$	$65,8 \pm 3,2$	5
	C-EH	$65,0 \pm 4,5$	$116,2 \pm 8,1$	9
<i>D. subspicatus</i>	D-IN	$163,1 \pm 12,9$	$288,5 \pm 29,7$	23
	D-CM	$113,6 \pm 4,1$	$202,1 \pm 10,1$	16
	D-EH	$149,3 \pm 15,8$	$293,32 \pm 20,2$	21

Fonte: A autora (2019)

Os resultados da produção de metano utilizando *C. vulgaris* no presente trabalho apresentaram valores inferiores quando comparado a estudos recentes. Zhang e Ogden (2017) utilizando *Chlorella sorokiniana*, produziram um volume de metano de aproximadamente 200-250 mL de CH₄/g alga para sua biomassa *in natura* e os resíduos após a extração lipídica (soxhlet/hexano e micro-ondas/clorofórmio-metanol). Sforza et al. (2017), utilizando condição similar ao presente estudo, com uma mistura etanol/hexano (2,5:1) para extração lipídica de *Chlorella vulgaris*, apresentou uma produção de metano superior de $150,2 \pm 14,6$ mL de CH₄/gSV. Em relação à produção de CH₄ obtido para *D. subspicatus*, os valores também foram superiores aos descritos na literatura. A extração lipídica de *Scenedesmus* sp. apresentou aumento no rendimento de 33% em relação à biomassa *in natura*, com produção de metano de 240 mL CH₄/g SV (KEYMER et al. 2013).

Tercero et al. (2014), utilizaram clorofórmio-metanol para extração de lipídio de *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella Protothecoides* pelo método de soxhlet. Os testes mostraram evidências de forte inibição da atividade metanogênica, sob as duas relações substrato/inóculo (0,5 e 0,3) testadas, não sendo detectável CH₄ no biogás, apenas CO₂. Yun et al. (2014) realizaram testes com *Chlorella vulgaris*, para avaliar a influência do clorofórmio

utilizado no processo de extração lipídica para posterior digestão anaeróbia. O clorofórmio exerceu efeito inibitório maior na produção de CH_4 , com valores de 125,2 mL de CH_4 /g DQO quando utilizado 0 mg CHCl_3 /L e 0 mL de CH_4 /g DQO quando utilizado 200 mg CHCl_3 /L.

No presente estudo, para ambas as espécies investigadas, a produção de CH_4 dos resíduos após extração com CM foram inferiores às amostras extraídas com EH. A partir dos resultados obtidos e comparados a outros estudos, pode-se afirmar que a mistura de solventes, principalmente clorofórmio-metanol, mesmo que particularmente volátil e lavada várias vezes antes do seu uso para digestão anaeróbia, ainda pode produzir efeitos inibitórios para bactérias metanogênicas. De acordo com Ehimen et al. (2009), aproximadamente 13,2% do peso seco de microalgas correspondem ao solvente conduzido na biomassa. Deve-se também levar em consideração que a lavagem da biomassa pode remover moléculas polares ricas em energia nos resíduos das microalgas após a extração, podendo reduzir o valor do poder calorífico da biomassa (EHIMEN et al. 2009).

A Tabela 16 mostra os valores dos parâmetros cinéticos inferidos para a produção acumulada de CH_4 e a Figura 7 apresenta as representações gráficas desses parâmetros.

Tabela 16 - Parâmetros cinéticos dos testes de BMP usando o modelo de Gompertz.

Espécie	Reatores	Bo (mL/g DQO)	K (mL/d g DQO)	λ (d)	R ²
<i>C. vulgaris</i>	C-IN	52,34	8,77	2,18	0,968
	CR-CM	-	-	-	-
	CR-EH	-	-	-	-
<i>D. subspicatus</i>	D-IN	162,68	19,19	2,62	0,998
	DR-CM	100,99	11,79	1,42	0,977
	DR-EH	139,90	15,11	0,35	0,988

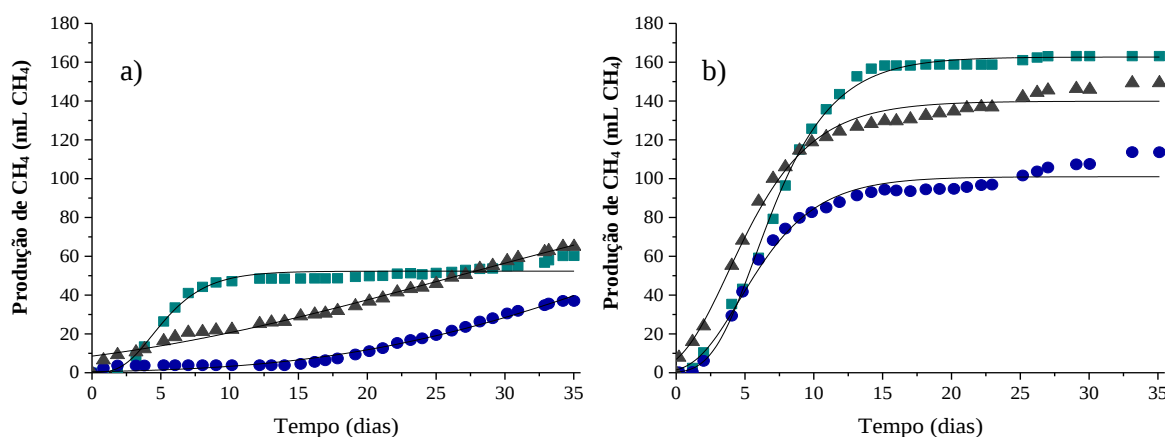
Fonte: A autora (2019)

Como verificado nos dados experimentais, o valor mais elevado do potencial de produção máxima de metano (Bo) foi registrado para a biomassa D-IN (162,68 mL/g DQO), enquanto que o menor valor foi apresentado pela C-IN (52,34 mL/g DQO). As biomassas CR-CM e CR-EH apresentaram comportamentos diferentes das demais condições, fazendo com que o modelo, apesar de apresentar aderência aos dados, não apresentasse coeficientes cinéticos coerentes.

As maiores taxas de produção máxima (K) foram observadas com D-IN e DR-EH, com valores de 19,19 e 15,11 mL/d g DQO, respectivamente. Ao comparar o valor de K de C-IN (8,77 mL/d g DQO) com D-IN (19,19 mL/d g DQO), observa-se que o valor foi inferior a

metade, dessa forma é possível constatar a elevada influência observada em relação às espécies de microalgas. Anteriormente, pesquisadores relataram uma taxa de produção inferior a esse estudo, de 2 mL/d g DQO (ZHANG e OGDEN, 2017). Em relação à fase lag (λ), os resíduos DR-CM e DR-EH apresentaram menores tempos (1,42 e 0,35 d) que seguem uma tendência em relação à DQO solúvel disponível no início do experimento, com percentuais de 4,2% e 23% da DQO total.

Figura 7 - Produção acumulada de metano (mL CH₄) ajustada ao modelo Gompertz. (a) *C. vulgaris* (b) *D. subspicatus*. IN (■), CM (●) e EH (▲)



Fonte: A autora (2019)

De acordo com estudos descritos na literatura (KEYMER, et al. 2013; HERNÁNDEZ et al. 2014; ZHANG e OGDEN, 2017) o processo de extração de lipídios tornou a biomassa mais acessível às bactérias presentes no processo de digestão anaeróbia. No entanto, a composição bioquímica da espécie utilizada, a remoção de parte do carbono durante o processo de extração e a inibição associada ao uso de solventes orgânicos influenciaram os resultados apresentados.

5.1.3 Solubilização de nutrientes

As concentrações de nitrogênio amoniacal (NH₄⁺) e ortofosfato (PO₄³⁻), presentes no efluente após a digestão anaeróbia, foram analisadas para avaliar seu potencial de reciclagem para o cultivo de microalgas. A Tabela 17 apresenta os valores referentes ao NH₄⁺ e PO₄³⁻ antes da digestão, referido como condição inicial (dia 0) e após a digestão, referido como condição final (dia 35).

A digestão anaeróbia resultou em um aumento nas concentrações de nitrogênio amoniacal (NH₄⁺) e ortofosfato (PO₄³⁻). As concentrações de NH₄⁺ no dia 0 variaram de 10-12

mg/L para *C. vulgaris* e 12-15 mg/L para *D.subspicatus*. Além da parcela presente na biomassa antes da inoculação dos reatores, esses valores podem ser explicados, principalmente pelo NH_4CL da solução de nutrientes utilizada. Valores superiores, de 18,3 mg/L foram relatados por Ayala-Parra, et al. (2017b).

Tabela 17 - Concentrações de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) e ortofosfato (PO_4^{3-}), antes e após digestão anaeróbia.

Espécie	Reatores	Condição inicial		Condição final	
		NH_4^+ (mg/L)	PO_4^{3-} (mg/L)	NH_4^+ (mg/L)	PO_4^{3-} (mg/L)
<i>C. vulgaris</i>	C-IN	12 ± 0,6	56 ± 3,8	142 ± 10,3	210 ± 10,0
	CR-CM	10 ± 0,2	43 ± 2,0	152 ± 7,1	144 ± 17,3
	CR-EH	11 ± 0,1	43 ± 4,4	152 ± 14,6	192 ± 14,4
<i>D. subspicatus</i>	D-IN	15 ± 1,5	57 ± 6,0	134 ± 10,1	165 ± 2,28
	DR-CM	15 ± 0,8	47 ± 5,0	138 ± 5,6	153 ± 14,7
	DR-EH	12 ± 0,2	51 ± 7,0	134 ± 21,1	139 ± 12,9

Fonte: A autora (2019)

Ao observar os dados iniciais (dia 0), pode-se constatar que a extração lipídica não provocou alteração significativa na parcela de NH_4^+ , em nenhuma das espécies. Outros estudos também apontaram que o pré-tratamento por sonicação e extração de lipídios não alteraram o NH_4^+ inicial (KEYMER, et al. 2013; AYALA-PARRA, et al. 2017b).

Ao final do processo de digestão, os valores de NH_4^+ corresponderam a 34 %, 33% e 28% para C-IN, CR-CM, CR-EH e 31%, 24% e 22% para D-IN, DR-CM, DR-EH, respectivamente, do nitrogênio total. O aumento de NH_4^+ , observado após a digestão muitas vezes está relacionada ao teor de proteínas presente no substrato (RAS, et al. 2011; KEYMER, et al. 2013).

Em relação às concentrações de PO_4^{3-} , suas concentrações no dia 0 variaram de 43-56 mg/L a 47-57 mg/L para *C. vulgaris* e *D.subspicatus*, respectivamente. Da mesma forma que o NH_4^+ , esses valores de PO_4^{3-} são explicados pela parcela do nutriente presente na biomassa e pelo K_2HPO_4 presente na solução de nutrientes utilizada. Além disso, a extração lipídica também não promoveu alteração significativa na solubilidade desse nutriente, seguindo a mesma tendência observada anteriormente para NH_4^+ e diferindo dos resultados encontrados por Ayala-Parra, et al. (2017b), que apresentaram um aumento de 2% de PO_4^{3-} após pré-tratamento por sonicação e extração de lipídios.

Os resultados mostram que há potencial para reciclar os efluentes gerados pela digestão de NH_4^+ e PO_4^{3-} . Mesmo com os resíduos após extração apresentando valores baixos,

principalmente para ortofosfato, após o processo de digestão, houve solubilização das frações particuladas. Mais investigações serão necessárias para determinar a adequação do nitrogênio e fósforo solubilizados como um suplemento de crescimento de algas.

5.2 Experimento 2 - Biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos submetida a pré-tratamento para hidrólise celular

5.2.1 Caracterização do substrato

O consórcio de micro-organismos fotossintéticos presentes na biomassa utilizada como substrato foi composto, predominantemente, por cianobactérias (99%) e por microalgas dos grupos Chlorophyta (<1%) e Euglenophyta (<1%) (Tabela 18).

Tabela 18 - Táxons identificados na biomassa utilizada como substrato

GRUPOS	ESPÉCIES
Cianobactéria	<i>Aphanocapsa</i> sp., <i>Cylindrospermopsis</i> sp., <i>Geitlerinema</i> sp., <i>Merismopedia tenuissima</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Planktothrix agardhii</i>
Chlorophyta	<i>Actinastrum</i> sp., <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Coelastrum</i> sp., <i>Cosmarium</i> sp., <i>Crucigenia</i> sp., <i>Desmodesmus armatus</i> , <i>Dictyosphaerium</i> sp., <i>Monoraphidium arcuatum</i> , <i>Pediastrum</i> sp., <i>Scenedesmus acuminatus</i> , <i>Tetraedron</i> sp.
Euglenophyta	<i>Trachelomonas</i> sp., <i>Lepocinclis</i> sp., <i>Phacus longicauda</i> , <i>Phacus curvicauda</i> , <i>Euglena acus</i>

Fonte: A autora (2019)

A Tabela 19 apresenta os valores médios, o desvio padrão e coeficiente de variação (%), referentes à caracterização da suspensão da biomassa concentrada.

Tabela 19 - Caracterização da suspensão de biomassa concentrada, com seus valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação (%).

Variáveis	Dados
pH	5,7 ± 0 (0,2)
DQO Total (mg/L)	8742 ± 37 (0,6)
DQO Solúvel (mg/L)	318 ± 7 (1,1)
Nitrogênio Total NTK (mg/L)	796 ± 1 (1,0)
Sólidos Totais (mg/L)	6210 ± 92 (1,5)
Sólidos Totais Voláteis (mg/L)	5180 ± 105 (2,0)
Proteínas (% ST)	47
Lipídios (% ST)	29
Carboidratos (% ST)	24

Fonte: A autora (2019)

A composição macromolecular foi de 47% de proteínas, 29% de lipídios e 24% de carboidratos. Em estudo realizado por Miao et al. 2013, a proteína representou a fração predominante da biomassa composta por cianobactérias, com valores percentuais de 59,87% de proteína, 8,26% de lipídio e 18,41% de carboidrato. Enquanto que, Mendez et al. (2015), apresentaram percentuais de 64% de proteína e teores de carboidrato variando entre 26-30%, para as cianobactérias *Synechocystis* sp. e *Borzia trilocularis*, enquanto que *Aphanizomenon planctonica* e *Aphanizomenon ovalisporum* apresentaram teor de proteína de 38% , com elevado teor de carboidratos variando entre 42-63%. O conhecimento da composição celular em termos de proteínas, lipídios e carboidratos é importante no processo de digestão anaeróbia, visto que estes constituintes apresentam diferentes potenciais de produção de metano (MUSSGUNG et al. 2010), no entanto, os percentuais dos constituintes macromoleculares variam de acordo com as condições de cultivo.

5.2.2 Otimização das condições de pré-tratamento

As Tabelas 20, 22 e 24 apresentam as matrizes dos planejamentos fatoriais 2^2 , com as variáveis nas suas formas codificadas e reais, e os resultados obtidos em termos de solubilização (%) para os pré-tratamentos testados. As estimativas dos efeitos principais e das interações das variáveis, os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância para os planejamentos estão apresentadas nas Tabelas 21, 23, e 25.

Pré-tratamento por ultrassom

Os resultados obtidos para o pré-tratamento por ultrassom apresentaram percentuais de solubilização de 0 a 8% (Tabela 20). A energia aplicada foi de 8,25 e 25,78 MJ/kg ST para os tempos de 10 e 30 min, respectivamente. Nos ensaios com temperaturas mais baixas (U1 e U3) não houve solubilização, enquanto que, com temperaturas mais elevadas (U2 e U4) a solubilização apresentou percentuais de 6 e 8%.

Tabela 20 - Variáveis e níveis codificados, relação DQOs/DQOt, energia aplicada (MJ/Kg ST) e percentual de solubilização (%) do planejamento fatorial 2² para o pré-tratamento por ultrassom

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Relação DQOs/DQOt	Energia aplicada (MJ/Kg ST)	Solubilização (%)
U1	30 (-1)	10 (-1)	0,033	8,25	0 ± 0,0
U2	80 (+1)	10 (-1)	0,101	8,25	6 ± 0,2
U3	30 (-1)	30 (+1)	0,035	25,78	0 ± 0,1
U4	80 (+1)	30 (+1)	0,114	25,78	8 ± 0,1

Fonte: A autora (2019)

A elevação da temperatura aumentou a solubilização em 7%, em média, no entanto, esse efeito foi mais evidente no tempo de 30 min. A temperatura, o tempo e sua interação, foram significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05) (Tabela 21).

Tabela 21 - Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,05$) do planejamento fatorial 2² para solubilização (%) da biomassa por ultrassom

Variável	Efeito	Erro padrão do efeito	p - valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Intercepto	3,44	0,07	0,000	3,44	0,07
(1) Temperatura (°C)	6,87	0,15	0,000	3,44	0,07
(2) Tempo (min)	0,67	0,15	0,002	0,33	0,07
Interação 1 com 2	0,67	0,15	0,002	0,33	0,07

R² = 0,996

Fonte: A autora (2019)

No geral, a temperatura apresentou um maior impacto na solubilização da biomassa do que a energia aplicada. O pré-tratamento por ultrassom com energia específica de 26,7 MJ/kg ST, aplicada a biomassa de microalgas, composta principalmente por clorofíceas (*Stigeoclonium* sp. e *Monoraphidium* sp.) e diatomáceas (*Nitzschia* sp. e *Amphora* sp.), apresentou aumento de 7% na solubilização (PASSOS, et al. 2014a). Uma energia específica mais elevada, de 100,7 e 128,9 MJ/kg ST, aplicada à biomassa de *Scenedesmus* sp., resultou no aumento de 8% na solubilização. O aumento da temperatura durante o pré-tratamento por ultrassom pode ter sido responsável pela maior biodegradabilidade encontrada (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al. 2012b). A exposição à alta temperatura durante o pré-tratamento com ultrassom pode, portanto, ser responsável por parte significativa da lise celular, observada em termos de solubilização.

Pré-tratamento por micro-ondas

No pré-tratamento por micro-ondas, a solubilização da biomassa variou entre 1 e 10% para as condições testadas (Tabela 22). Para os ensaios M1 e M2, combinando um tempo de exposição de 1 min, com potência de 300 e 900 W, a solubilização aumentou 5%, enquanto que, com tempos de exposição de 5 min (M3 e M4) aumentou 4%. O rendimento médio foi de 4,4 e 4,5 % com o aumento da potência e do tempo de exposição, respectivamente. No pré-tratamento por micro-ondas, assim como por ultrassom, o grau de solubilização aumenta, com o acréscimo da energia específica (PASSOS, et al 2013a).

Tabela 22 - Variáveis e níveis codificados, relação DQOs/DQOt e percentual de solubilização (%) do planejamento fatorial 2^2 para o pré-tratamento por micro-ondas

Experimento	Potência (W)	Tempo (min)	Relação DQOs/DQOt	Energia aplicada (MJ/Kg ST)	Solubilização (%)
M1	300 (-1)	1 (-1)	0,048	0,86	1 ± 0,2
M2	900 (+1)	1 (-1)	0,100	2,58	6 ± 0,3
M3	300 (-1)	5 (+1)	0,101	4,30	6 ± 0,4
M4	900 (+1)	5 (+1)	0,134	12,89	10 ± 0,2

Fonte: A autora (2019)

Com a análise estatística (Tabela 23), verificou-se que a potência e o tempo de exposição foram significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05), no entanto não houve evidência de interação entre as duas variáveis (p-valor = 0,28).

Tabela 23 - Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,05$) do planejamento fatorial 2^2 para solubilização (%) da biomassa por micro-ondas

Variável	Efeito	Erro padrão do efeito	p - valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Intercepto	5,62	0,43	0,000	5,62	0,43
(1) Potência (W)	4,44	0,86	0,001	2,22	0,43
(2) Tempo (min)	4,51	0,86	0,001	2,25	0,43
Interação 1 com 2	-0,99	0,86	0,284	-0,49	0,43

$R^2 = 0,873$

Fonte: A autora (2019)

Em estudo realizado por Passos et al. (2013a), o grau de solubilização da mistura de biomassas de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp., pré-tratadas com micro-ondas, aumentou linearmente com a energia específica aplicada, independente da potência e tempo de exposição, com a mais alta energia aplicada (65,4 MJ/kg TS) apresentando 8% de solubilização. Neste trabalho foi observado que uma menor energia específica aplicada (M2), resultante da associação de uma maior potência (900 W) e menor tempo de exposição (1 min)

apresentou o mesmo percentual de solubilização do ensaio (M3) com maior energia específica, menor potência (300 W) e maior tempo de exposição (5 min).

Pré-tratamento hidrotérmico

No pré-tratamento hidrotérmico a solubilização da biomassa variou entre 9 e 17 % (Tabela 24). A elevação da temperatura (100-120 °C) aumentou o percentual de solubilização para todas as condições, no entanto, esse efeito foi mais evidente ao tempo de 30 min. A solubilização aumenta em 5,4%, em média, com o aumento da temperatura, enquanto que, apresenta um acréscimo de 2,8%, em média, com o aumento do tempo.

Tabela 24 - Variáveis e níveis codificados, relação DQOs/DQOt e percentual de solubilização (%) do planejamento fatorial 2² para o pré-tratamento hidrotérmico

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Relação DQOs/DQOt	Solubilização (%)
H1	100 (-1)	10 (-1)	0,127	9 ± 0,2
H2	120 (+1)	10 (-1)	0,162	13 ± 0,3
H3	100 (-1)	30 (+1)	0,137	10 ± 0,7
H4	120 (+1)	30 (+1)	0,203	17 ± 0,6

Fonte: A autora (2019)

Todas as variáveis foram significativas para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05) e influenciaram positivamente a solubilização da biomassa, ou seja, aumentando a temperatura e tempo aumentou-se a DQO solúvel (Tabela 25).

Tabela 25 - Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,05$) do planejamento fatorial 2² para solubilização (%) da biomassa pelo tratamento hidrotérmico.

Variável	Efeito	Erro padrão do efeito	p – valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Intercepto	12,09	0,32	0,000	12,09	0,32
(1) Temperatura (°C)	5,38	0,64	0,000	2,69	0,32
(2) Tempo (min)	2,78	0,64	0,002	1,39	0,32
Interação 1 com 2	1,73	0,64	0,026	0,87	0,32

R² = 0,924

Fonte: A autora (2019)

Valores próximos a este estudo foram discutidos por Bohutskyi et al. (2014). Os autores investigaram o efeito do pré-tratamento hidrotérmico a 120 ° C por 30 min. Os resultados demonstraram um efeito mínimo na solubilização de *Chlorella* sp. (13 %) e um efeito moderado sobre *Nannochloropsis* sp. (22 %), associados à diminuição gradual da pressão ao término do pré-tratamento. Este fato também ocorreu no presente estudo. Sabe-se

que, uma súbita queda da pressão leva à maior desintegração da biomassa (KEYMER et al. 2013).

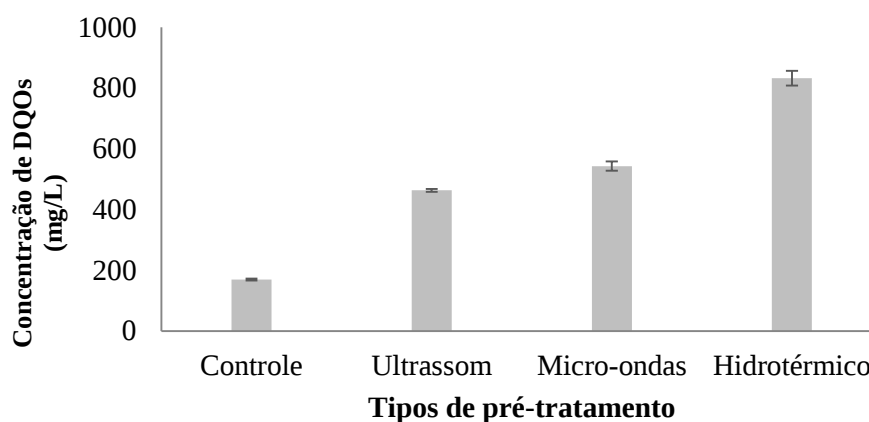
Em estudo realizado por Passos e Ferrer, (2015), a solubilização de uma biomassa mista de microalgas apresentou aumento de DQO solúvel de 8 e 9% após pré-tratamento a 110°C e 13 a 15% após pré-tratamento a 130 °C. Da mesma maneira, no presente trabalho, a temperatura também foi mais relevante que o tempo de exposição.

Cho et al. (2013), atingiu uma solubilização de 30% ao aplicar o pré-tratamento hidrotérmico em biomassa composta por *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., a 120 °C por 30 min. Por outro lado, em estudo realizado por Alzate et al. (2012), a solubilização da biomassa de *Acutodesmus obliquus* e *Oocystis* sp. e a biomassa de *Microspora* sp. foi aumentada em 37% e 40% após o pré-tratamento a 140 °C por 15 min, respectivamente; enquanto que a biomassa de *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Nannochloropsis* sp. atingiu uma solubilização de 16% sob as mesmas condições. Os últimos resultados são semelhantes ao presente estudo.

Comparação entre os pré-tratamentos

Com base nos melhores resultados obtidos para cada tipo de pré-tratamento (Figura 8), concluiu-se que o pré-tratamento hidrotérmico, com tempo de exposição de 30 minutos a 120 °C, foi o mais eficiente em termos de aumentar a DQO solúvel.

Figura 8 - Comparação entre as melhores condições encontradas para os pré-tratamentos por ultrassom, por micro-ondas e hidrotérmico, em termos de DQOs (mg/L) (■).



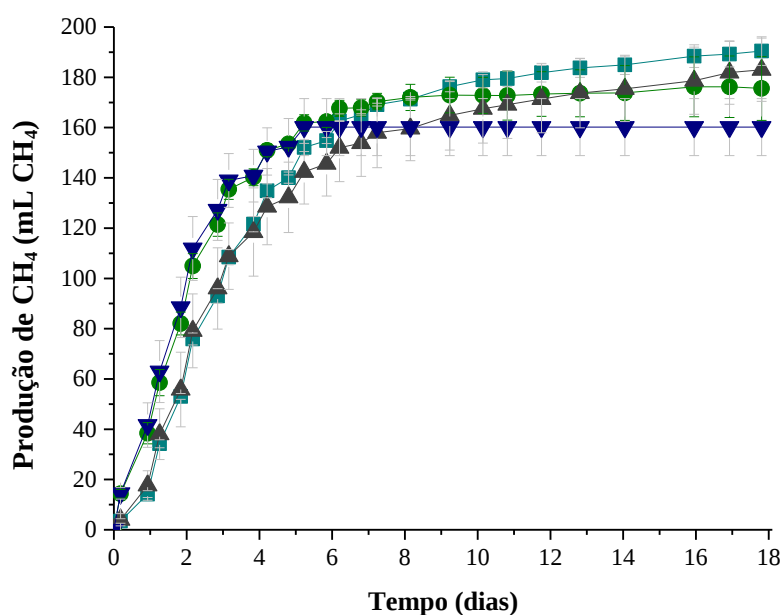
Fonte: Autora (2019)

Semelhantemente, níveis de lise celular crescente do pré-tratamento por ultrassom, micro-ondas e térmico a 100 °C foram relatados (SCHWEDE et al. 2011). Após essa avaliação, o pré-tratamento que apresentou maior solubilização foi aplicado à biomassa para a realização do teste de potencial bioquímico de metano (PBM).

5.2.3 Teste do potencial bioquímico de metano (PBM) em amostra pré-tratadas hidrotermicamente

A produção acumulada de metano para as biomassas *in natura* (IN), pré-tratada (PT), *in natura* + nutrientes (INN) e pré-tratada + nutrientes (PTN), durante o período de incubação de 18 dias, é mostrada na Figura 9.

Figura 9 – Produção acumulada de CH₄ (mL CH₄) nos testes de BMP após pré-tratamento. Biomassa *in natura* - IN (■), biomassa pré-tratada- PT (●), biomassa *in natura* + nutrientes - INN (▲) e biomassa pré-tratada + nutrientes - PTN (▼).



Fonte: A autora (2019)

Para a condição sem adição de nutrientes, IN e PT, os valores foram $190 \pm 5,7$ mLCH₄ e $176 \pm 12,7$ mLCH₄, respectivamente. Enquanto que, a condição com adição de nutrientes, apresentou menores rendimentos de $183 \pm 12,6$ mLCH₄ para a IN+N e $160 \pm 11,3$ mLCH₄ para PT+N.

Conforme pode ser observado, houve um comportamento semelhante até o 3º dia de experimento, entre as biomassas *in natura* e entre as biomassas pré-tratadas, com valores

ligeiramente superiores para as condições com adição de nutrientes. De forma geral, esse comportamento foi observado até o 8º dia, com exceção da biomassa PT + N, que permaneceu constante após 5 dias de digestão. Após o 8º dia, as biomassas *in natura* apresentaram maior produção de metano em comparação às pré-tratadas, no entanto, esses valores já representavam 90%, 98% e 86% do volume final apresentado, para IN, PT e IN+N, respectivamente.

Para avaliar se as diferentes condições apresentaram diferenças significativas, foi aplicado o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey (5%). Os resultados da ANOVA para a produção de metano confirmaram que os grupos sem adição de nutrientes (IN e PT) e com adição de nutrientes (IN+N e PT+N) apresentam diferença significativa (Tabela 26).

Tabela 26 - ANOVA da produção de metano ($P\ CH_4$) para as condições testadas no teste do potencial bioquímico de metano (PBM)

Fator	GL	Soma dos quadrados (SQ)	Média dos quadrados (MQ)	Valor de F	P-valor
$P\ CH_4$	3	1494,34	498,11	4,94	0,03
Error	8	806,20	100,78		
Total	11	2300,54			

Fonte: A autora (2019)

O teste Tukey a 5% indicou diferença significativa apenas entre os grupos *in natura* (IN) e pré-tratado com adição de nutrientes (PT+N) (Tabela 27). Mesmo que o pré-tratamento da biomassa aumentasse a produção de metano, a biodegradabilidade anaeróbia ainda foi baixa (<51%), indicando que a maior parte da matéria orgânica não estava prontamente disponível para a digestão. Os percentuais do presente estudo foram superiores aos encontrados por Passos et al. (2013b), que descreveu valores de biodegradabilidade inferiores a 47% utilizando uma mistura de microalgas pré-tratadas termicamente a 55, 75 e 95°C.

Tabela 27 - Produção acumulada de ($mLCH_4$), produção específica ($mLCH_4/g\ DQO$) e biodegradabilidade anaeróbia (%) para as condições testadas nos testes de PBM

Reatores	Produção acumulada de CH_4 ($mLCH_4$)	Produção específica ($mLCH_4/g\ DQO$)	Biodegradabilidade anaeróbia (%)
IN	190 ± 5,7 a*	369 ± 11,1	54
PT	176 ± 12,7 ab	342 ± 24,4	50
IN+N	183 ± 12,6 ab	355 ± 24,6	52
PT+N	160 ± 11,3 b	311 ± 5,1	46

*Teste de Tukey a 5%, os valores médios com a mesma letra não diferem significativamente.

Fonte: A autora (2019)

Diferentes micro-organismos estavam presentes na biomassa utilizada, porém as cianobactérias consistiram em aproximadamente 99% da biomassa total. Diante dessa estimativa, pode-se atribuir a maior produtividade de metano da biomassa *in natura* à presença destes micro-organismos. A parede celular das cianobactérias, quando presente, contém uma camada de peptidoglicano que se assemelha à das bactérias Gram-negativas, com ausência de polímeros complexos e, portanto mais facilmente digerida (HOICZYK e HANSEL, 2000). No entanto, a presença de compostos recalcitrantes como poliaromáticos, heteropolissacarídeos, algaenana, esporopolenina, sílica, ácido urônico, lignina e toxinas (MCs-microcistinas) podem influenciar o desempenho da digestão anaeróbia de cianobactérias (SIALVE et al. 2009).

As menores produções de metano apresentadas pelas biomassas pré-tratadas podem ser atribuídas à natureza da DQO solúvel liberada após o pré-tratamento. Temperaturas elevadas podem conduzir a uma diminuição da biodegradação, ao invés de aumentar as eficiências da solubilização. Este processo pode está associado às reações de Maillard, que envolvem carboidratos e proteínas na formação de moléculas insaturadas que se polimerizam dando origem a pigmentos castanhos (melanoídnas) insolúveis, muito dificilmente biodegradáveis (CARRERE et al. 2010; LIU et al. 2012). A mudança de cor da biomassa para uma coloração marrom, verificada após o pré-tratamento, sugere que houve reações de Maillard durante o processo. Dessa forma, quando a técnica de pré-tratamento aumenta a solubilização da biomassa, mas o rendimento de metano permanece igual ou menor que o controle sem tratamento, uma possível explicação é a formação de compostos recalcitrantes ou tóxicos ao metabolismo das bactérias metanogênicas (WILSON E NOVAK, 2009; PASSOS et al. 2014c).

Os resultados do presente estudo, para a biomassa *in natura*, são superiores aos de estudos anteriores, que também investigaram a produção de metano com cianobactérias. Mendez et al. (2015), realtaram um rendimento máximo de 168 e 187 mL CH₄/g DQO para *Borzia trilocularis* e *Anabaena planctonica*, respectivamente, com uma acelerada produtividade de metano, permanecendo constante após 12 dias de digestão. Por outro lado, uma biomassa composta principalmente por *Microcystis* sp., investigada por Miao et al. (2013), apresentou rendimento de metano, variando de $181,7 \pm 10,3$ a $287,6 \pm 11,2$ mL CH₄/g DQO.

Alzate et al. (2012) comprovaram que o pré-tratamento hidrotérmico foi eficaz no aumento da biodegradabilidade anaeróbica de micro-organismos fotossintéticos, com rendimento de metano de 398 ± 9 mL CH₄/g SV, pré-tratadas a 110 °C por 15 min, resultando

no aumento de 31% na produção de metano. Enquanto que Jegede et al. (2012), apresentou rendimento de 78 ± 25 mL/L.d. para cianobactéria *Gloethece membranacea*, submetida a 110 °C por 10 min.

Cho, et al., (2013), relataram aumento de 20% da produção de metano, utilizando biomassa composta por *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., pré-tratadas termicamente a 120 °C por 30 min, produzindo o mais alto rendimento de metano de 405 mL CH₄/g SV em comparação a biomassa não tratada (336 mL CH₄/g SV). Enquanto que, Passos e Ferrer (2015) tiveram um rendimento de metano aumentado em 24 e 39% após o pré-tratamento a 110 e 130 °C por 15 min, respectivamente, com rendimentos de 150 mL de CH₄/g DQO e 170 mL de CH₄/g DQO.

De fato, além de poucos estudos utilizaram cianobactérias para produção de metano (JEGEDE et al. 2012; MIAO, et al. 2013; MENDEZ et al. 2015) também foi demonstrado que a biodegradabilidade anaeróbica é depende da espécie e, principalmente, da estrutura da parede celular (MUSSGNUM et al. 2010).

Para compreender a cinética do processo, os dados experimentais foram modelados usando a equação de Gompertz (Tabela 28). Foi possível constatar que o modelo aderiu bem aos dados obtidos experimentalmente, conforme evidenciado pelos valores do coeficiente de correlação (R^2). O ajuste do modelo é mostrado na figura 10.

Tabela 28 - Parâmetros cinéticos dos testes de BMP usando o modelo de Gompertz.

Reatores	Bo (mL/g DQO)	K (mL/d g DQO)	λ (d)	R^2
IN	183,06	37,52	0,40	0,994
PT	172,94	47,31	0,08	0,995
IN+N	172,54	34,53	0,20	0,988
PT +N	160,32	55,88	0,17	0,997

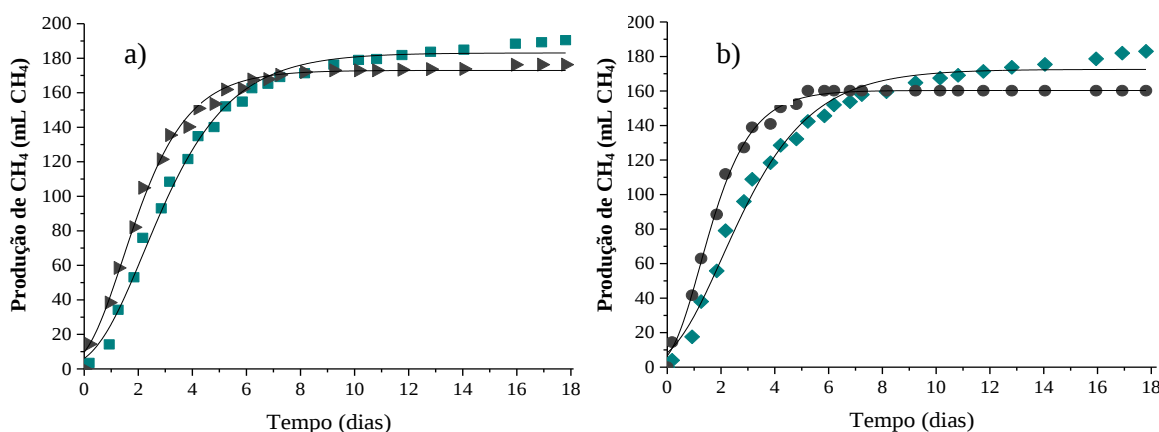
Fonte: A autora (2019)

Como verificado nos dados experimentais, o potencial de produção máxima de metano (Bo) foi registrado para a condição *in natura* (IN) sem adição de nutrientes. Como discutido anteriormente, a taxa de produção máxima (K) foi superior nos testes realizados com biomassa pré-tratada, PT (47,31 mL/d g DQO) e PT+N (55,88 mL/d g DQO). Isso se deve ao fato que a hidrólise, promovida pelo pré-tratamento, disponibiliza maior parcela de substrato para assimilação pelos micro-organismos.

Dessa forma, devido ao esgotamento dos substratos hidrolisados houve mais rápida estabilização da produção de metano para essas biomassas. Em relação à fase de latência (λ),

os testes com a biomassa pré-tratada, PT e PT+N, apresentaram menores tempos (0,08 e 0,17 d.) em comparação à biomassa IN e IN+N (0,40 e 0,20 d.). Esses valores foram menores em relação à fase lag (0,5 - 3,4 d) descrita por Miao et al. (2013), utilizando cianobactérias *in natura*.

Figura 10 – Produção acumulada de CH₄ (mL CH₄) ajustada ao modelo Gompertz. (a) Digestão sem adição de nutrientes: (■) IN, (►) PT; (b) Digestão com adição de nutrientes (■) IN+N, (●) PT+N



Em relação à adição de nutrientes, como já foi mencionado anteriormente, o teste Tukey a 5% indicou diferença significativa apenas entre os grupos *in natura* (IN) e pré-tratado com adição de nutrientes (PT+N), que provavelmente deve-se apenas à condição do pré-tratamento aplicado. Nutrientes e um tampão de pH são adicionados para que o único parâmetro que afeta a taxa de produção de metano seja a condição da própria biomassa. (CHO, et al. 2005). Em relação à produção de metano a partir de micro-organismos fotossintéticos, com predominância de cianobactérias, o pré-tratamento pode ser dispensável.

5.3 Experimento 3 - Biomassa de *Chlorella* sp. submetida à pré-tratamento biológico, por enzimas endógenas de micro-organismos fúngicos.

5.3.1 Meio de cultura e substrato

Neste estudo acerca do pré-tratamento de biomassa microalgal com simultânea produção de enzimas, a fermentação foi realizada utilizando a biomassa comercial de *Chlorella* sp. como fonte de carbono (substrato indutor), com o objetivo de ser pré-tratada biologicamente pela ação dos micro-organismos. Em termos de comparação, também foi

utilizada a celulose microcristalina como substrato indutor e o meio sintético de Mandels e Weber (1969), frequentemente utilizando para crescimento de micro-organismos. A Tabela 29 apresenta os resultados referentes à caracterização do efluente anaeróbico e da biomassa comercial de *Chlorella* sp.

Tabela 29 - Caracterização do efluente anaeróbico usado como meio de cultivo e da biomassa de *Chlorella* sp. utilizada como substrato indutor.

Variáveis	Efluente anaeróbico	<i>Chlorella</i> (comercial)
pH	7,3 ± 0,0	5,9 ± 0,1
Condutividade (µs/cm)	774	162
DQO total (mg/L)	85 ± 5,8	1392 ± 24,7
DQO solúvel (mg/L)	74 ± 4,3	88 ± 8,5
Sulfato (mg/L)	40 ± 0,2	13 ± 0,6
Nitrogênio total (mg/L)	25 ± 2,0	75 ± 4,5
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	20 ± 1,5	3 ± 0,1
Fósforo total (mg/L)	3 ± 0,1	8 ± 0,5
Sólidos totais (mg/L)	505 ± 21,2	629 ± 24,0
Sólidos totais fixos (mg/L)	494 ± 11,3	5 ± 7,0
Sólidos totais voláteis (mg/L)	11 ± 4,2	624 ± 16,9

Fonte: A autora (2019)

Diversos meios de suplementação são usados para suprir os requerimentos nutricionais dos micro-organismos produtores de enzimas, principalmente, em termos de carbono, nitrogênio e fósforo (VRIES e VISSER, 2001). Neste sentido, o efluente anaeróbico é uma fonte interessante de nutrientes a serem recuperados por meio da produção enzimática, contribuindo também para o pré-tratamento de microalgas.

5.3.2 Pré-tratamento e produção enzimática

O pré-tratamento biológico foi aplicado usando esporos de *Aspergillus niger* (URM 4645) e *Trichoderma aureoviride* (URM 5574) em meio de cultura com a biomassa de *C. vulgaris* (substrato indutor) para a produção de celulasas, para realização da fermentação submersa. Os testes foram realizados em condições apropriadas para o desenvolvimento dos fungos e produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradação do substrato.

A suspensão de esporos da linhagem *Aspergillus niger* (URM 4645) e *Trichoderma aureoviride* (URM 5574), após o cultivo em meio ágar malte, resultou na concentração de $2,25 \times 10^8$ esporos/mL e $8,58 \times 10^7$ esporos/mL, respectivamente. Durante o processo de

fermentação, as duas espécies fúngicas apresentaram atividade celulolítica ao utilizar *C. vulgaris* como fonte de carbono.

O fungo *A. niger* apresentou melhores resultados de atividade celulolítica em relação à *T. aureoviride*, assim como o uso do efluente anaeróbico como meio de cultura se destacou entre os testes. Conforme pode ser observado (Tabela 30), em comparação à utilização da celulose microcristalina, como substrato indutor (AE1), a FPase do AE2 no 4º dia atingiu valores percentuais de 51% da atividade total de AE1 apresentada no 7º dia. Quando comparada com a atividade celulolítica do 4º dia da AE1 ($0,147 \pm 0,046$), a produção de AE2 apresentou percentual de 71%. Em relação à CMCase, o tratamento AE2, no 7º dia, apresentou atividade celulolítica superior ao AE1, com valores de $0,873 \pm 0,015$ U/mL e $0,828 \pm 0,026$ U/mL, respectivamente.

Tabela 30 - Valores máximos de atividades celulolíticas (FPase e CMCase) registrados para os diferentes tipos de tratamentos

Ensaio	Tratamentos	FPase (Atv. U/mL)	Dia	CMCase (Atv. U/mL)	Dia
1	AE1	$0,202 \pm 0,046$	7	$0,828 \pm 0,026$	7
2	AE2	$0,103 \pm 0,012$	4	$0,873 \pm 0,015$	7
3	AM1	$0,061 \pm 0,004$	4	$0,325 \pm 0,062$	7
4	AM2	$0,061 \pm 0,055$	7	$0,202 \pm 0,020$	5
5	TE1	$0,062 \pm 0,047$	7	$0,086 \pm 0,020$	5
6	TE2	$0,059 \pm 0,038$	7	$0,154 \pm 0,070$	7
7	TM1	$0,036 \pm 0,007$	4	$0,016 \pm 0,002$	5
8	TM2	$0,051 \pm 0,032$	7	$0,052 \pm 0,015$	6

Legenda: Tratamentos: Fungo + meio de cultura + substrato indutor. **AE1:** *A. niger* + efluente anaeróbico + celulose; **AE2:** *A. niger* + efluente anaeróbico + *C. vulgaris*; **AM1:** *A. niger* + meio sintético + celulose; **AM2:** *A. niger* + meio sintético + *C. vulgaris*; **TE1:** *T. aureoviride* + efluente anaeróbico + celulose; **TE2:** *T. aureoviride* + efluente anaeróbico + *C. vulgaris*; **TM1:** *T. aureoviride* + meio sintético + celulose; **TM2:** *T. aureoviride* + meio sintético + *C. vulgaris*.

Fonte: A autora (2019)

Diante do exposto, o tratamento da biomassa de *C. vulgaris* por *A. niger* utilizando efluente anaeróbico como meio de cultivo (AE2) foi selecionado para os ensaios posteriores de potencial bioquímico de metano (PBM), apresentando resultados satisfatórios de FPase ($0,103 \pm 0,012$ U/mL), CMCase ($0,873 \pm 0,026$ U/mL) e 3448 mg/L de proteína total, em relação aos demais tratamentos. Nos testes utilizando apenas *C. vulgaris*, sem o fungo, não foi observada atividade celulolítica.

É importante ressaltar que, além de apresentar as melhores atividades celulolíticas, uma agregação da biomassa em *pellets* foi observada por *A. niger*, enquanto que *T.*

aureoviride não apresentou essa condição. Pode ser inferido que outros fatores, como agitação e temperatura, podem ter influenciado na morfologia dos micro-organismos.

A formação de *pellets* é um fator interessante, pois facilita a separação da biomassa do sobrenadante. Fungos filamentosos como *Aspergillus* sp. têm sido utilizados como agentes de biofloculação para auxiliar na colheita de microalgas (CHEN et al. 2018; YANG et al. 2019).

A produção de celulases associada ao pré-tratamento de *Chroococcus* sp., foi relatada anteriormente (PRAJAPATI et al., 2016). No estudo, a biomassa composta por *pellets* da microalga com o fungo *Aspergillus lentulus*, apresentou atividade enzimática superior (0,4 FPU/mL) à encontrada no presente estudo. No entanto, deve-se levar em consideração que, para a determinação da atividade enzimática, a biomassa de F/M (aproximadamente 1 g de peso seco) foi suspensa em somente 2 mL de água deionizada. Sabe-se que são recorrentes os relatos em relação à baixa concentração de produtos finais encontrados em processos de fermentação submersa (SRIVASTAVA et al. 2018), dessa forma, a menor produção encontrada neste trabalho está possivelmente associada à maior diluição no meio líquido.

Os valores encontrados podem ainda ser comparados com a produção de enzimas brutas externas, comumente utilizadas para a hidrólise de microalgas. O bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como substrato para fermentação em estado sólido pelo *Aspergillus lentulus*. A atividade da celulase (enzima bruta) foi 0,169 FPU/mL, enquanto que o conteúdo de proteína foi 4005 mg/L (PRAJAPATI et al. 2015 a). De fato, a ação celulolítica de enzimas brutas externas aplicadas a parede celular de microalgas foi comprovada resultando na liberação de açúcares, equivalente a 21 FPU/ g de biomassa microalgal (PRAJAPATI et al. 2015 a; PRAJAPATI et al. 2015 b). No entanto, devem ser realizados testes para determinar as condições operacionais (pH e temperatura), a concentração enzimática ótima e o tempo de incubação necessário para um pré-tratamento significativo (DEMUEZ et al. 2015; CAVINATO et al. 2017).

Baseado nos valores obtidos, o uso de *C. vulgaris* para produção de enzimas, associada ao seu pré-tratamento, pode ser considerada uma alternativa promissora, visto que a celulose compreende cerca de 70-80% da massa seca da parede celular de *C.vulgaris* (ABOSHADY et al. 1993) e mesmo assim, foram observados valores relevantes tomando como base a literatura e, principalmente, a celulose microcristalina como parâmetro para esse estudo.

Em relação ao efluente anaeróbio, foi demonstrada viabilidade do seu uso como meio de cultura para fermentação submersa. No entanto, maiores investigações devem ser realizadas em relação às exigências nutricionais do micro-organismo para que sejam

alcançadas expressivas produtividades de celulase. Esse efeito positivo apresentado pode estar associado a uma maior concentração de nutrientes como, por exemplo, as diversas formas de nitrogênio presentes (nitrato e amônia) em combinação com a suplementação utilizada (LIBARDI, et al. 2017). A fonte de nitrogênio é muito importante para biossíntese de componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e quitina. A amônia é o maior regulador da assimilação de nitrogênio e, na sua presença, a utilização de outras fontes nitrogenadas pode ser limitada (METI, et al. 2011).

Em estudo realizado por Libardi et al. (2017), a espécie fúngica *Trichoderma harzianum*, por exemplo, apresentou atividades de FPase (4,5 U/mL) e CMCase (8,2 U/mL), após 6 dias de fermentação, utilizando água residual suplementada como meio de cultura e celulose microcristalina como substrato indutor.

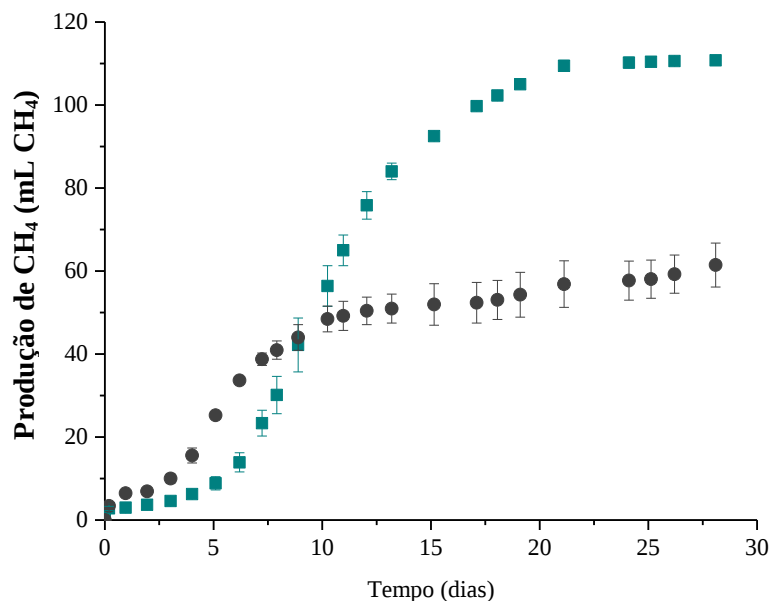
A produção de celulase utilizando o efluente anaeróbio como alternativa de meio de cultura para fermentação submersa poderá contribuir para a recuperação de nutrientes, além de permitir o reuso de água. A utilização da microalga, como substrato indutor, permite a hidrólise da biomassa, através das enzimas celulolíticas que, simultaneamente, podem ser recuperadas para o pré-tratamento de outras biomassas. Essa proposta é interessante para reduzir os custos associados à produção de enzima e aos outros tipos de pré-tratamentos utilizados para hidrolisar a biomassa de microalgas. Além disso, contribui para o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis.

5.3.3 Teste do potencial bioquímico de metano (PBM)

A biomassa de *C. vulgaris*, pré-tratada por *A. niger* (AE2), composta por microalga e fungo (em *pellets*), foi então submetida à digestão anaeróbia com objetivo de determinar sua biodegradabilidade e o Potencial Bioquímico de Metano (PBM). A produção acumulada de metano para a biomassa de *C. vulgaris* controle (C-C) e a biomassa pré-tratada (C-PT), durante o período de incubação de 28 dias, é mostrada na Figura 11.

A biomassa controle (C-C) apresentou um volume final de metano superior à biomassa pré-tratada (C-PT) com valores de $111 \pm 0,6$ mLCH₄ e $62 \pm 5,3$ mLCH₄ e produção específica de metano de $222 \pm 1,3$ mL CH₄/g DQO e $124 \pm 1,3$ mL CH₄/g DQO, respectivamente.

Figura 11 – Produção acumulada de CH₄ em testes de PBM utilizando biomassa de *Chorella* sp. submetida à pré-tratamento enzimático. *Chlorella* controle: C-C (■) e pré-tratada (●)



Fonte: A autora (2019)

A produção diária de metano a partir da biomassa C-PT atingiu valor máximo de $10 \pm 0,9$ mL CH₄/g DQO/d nos primeiros 5 dias, comparado com apenas $2,6 \pm 0,6$ mL CH₄/g DQO/d para a biomassa C-C, que apresentou seu pico de produção no 7º dia, com valor próximo ao C-PT ($9,4 \pm 3,1$ mL CH₄/g DQO por dia). A produção de metano da biomassa de C-PT permaneceu entre 3 e 10 mL CH₄/g DQO por dia, durante o 3º e 7º dia, com produção variando após esse período.

Considerando que a produção diária máxima de metano da biomassa C-PT foi observada nos 10 primeiros dias, pode-se inferir que houve uma maior disponibilidade dos substratos hidrolisados. Além disso, durante os últimos 20 dias do processo, a produção de metano a partir da biomassa C-PT foi menor do que a da biomassa C-C, indicando uma hidrólise mais lenta da biomassa C-C. Essa redução no rendimento de metano da biomassa C-PT, observada a partir do 10º dia, pode ser atribuída ao esgotamento dos substratos hidrolisados.

Comportamento similar foi relatado por Prajapati et al. (2015b), com maior produção de metano durante a fase inicial da digestão anaeróbia da biomassa de *Chroococcus* sp., pré-tratada com enzima externa bruta de *Aspergillus lentulus*. Os autores observaram redução no rendimento de metano, a partir 10º dia, que foi atribuída à utilização da biomassa de microalgas solubilizadas por fungos, para crescimento adicional. No entanto, foi observado

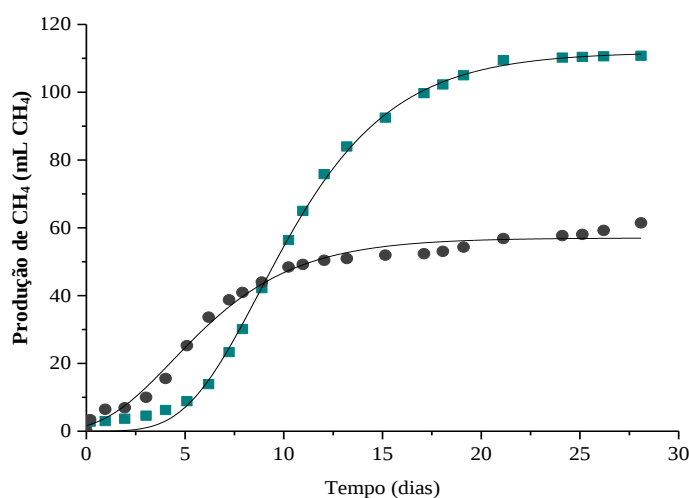
um aumento da produção acumulada em 28% para biomassa não tratada e pré-tratada, respectivamente.

A menor produção de metano de C-PT encontrada neste estudo pode estar associada ao tempo de fermentação utilizado para o pré-tratamento (7 dias). Prajapati et al. (2016) apresentou maior produção de metano ($382,11 \pm 2,54 \text{ mL CH}_4 \text{ g/SV}$), após apenas 3 dias de fermentação, utilizando biomassa de *Chroococcus* sp., colhida pelo processo de biofloculação com o fungo *Aspergillus lentulus*. Os autores comprovaram o efeito do tempo de fermentação quando comparado com os valores de produção entre os tempos de 0 a 5 dias. Além disso, também foi demonstrado que durante o processo de biofloculação já houve pré-tratamento da biomassa, contribuindo assim, para os maiores valores encontrados.

A produção de metano com biomassa pré-tratada por fungos têm se destacado, revelando aumentos significativos no rendimento de metano quando comparado à biomassa não tratada (PRAJAPATI et al. 2016). Além disso, apresentando, sobretudo, valores superiores às biomassas pré-tratadas com enzimas comerciais. A aplicação de um pré-tratamento enzimático à biomassa de *Oocystis* sp., realizado por Hom-Diaz et al. (2016), aumentou o rendimento de metano em 20%, usando enzima lacase comercial, enquanto que, o pré-tratamento usando a enzima fúngica bruta de *Trametes versicolor* (100 U/L), promoveu um aumento de 74%.

Os dados da produção acumulada de metano foram ajustados com o modelo de Gompertz (Figura 12).

Figura 12 – Produção acumulada de CH_4 (mL CH_4) ajustada ao modelo Gompertz. Controle: C-C (■) e pré-tratada: C-PT (●)



Fonte: A autora (2019)

A Tabela 31 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos inferidos. Os dados mostraram boa adequação ao modelo cinético, no entanto, o valor de R^2 foi superior para a biomassa C-C. O potencial de produção máxima (B_0) foi de 57,01 mL/g DQO para a biomassa C-PT, equivalendo a 51% da produção da biomassa C-C (111,87 mL/g DQO). Da mesma forma, a taxa da produção máxima (K) para a biomassa C-C (11,08 mL/d g DQO) foi praticamente duplicada em relação à biomassa C-PT (6,22 mL/d g DQO).

Tabela 31 - Parâmetros cinéticos dos testes de BMP usando o modelo de Gompertz

Espécie	Reatores	B_0 (mL/g DQO)	K (mL/d g DQO)	λ (d)	R^2
<i>C. vulgaris</i>	C-C	111,87	11,08	5,06	0,998
	C-PT	57,01	6,22	1,06	0,986

Fonte: A autora (2019)

Em relação à fase de latência (λ), a biomassa C-PT apresentou um período menor em relação à biomassa C-C (1,06 e 5,06 d, respectivamente), confirmando a presença de compostos solúveis prontamente disponíveis para a assimilação pelos micro-organismos. A biodegradabilidade anaeróbia estimada foi de 31% e 16% para C-C e C-PT, respectivamente.

Apesar da baixa produção de metano obtida neste experimento, as considerações relatadas permitem concluir que o método de pré-tratamento investigado tem potencial como uma alternativa para melhorar a produção de metano, a partir da biomassa de microalgas. Essa afirmação parte da observação de que houve uma maior parcela de substrato disponível nos primeiros 10 dias do processo de digestão anaeróbia, a partir da biomassa pré-tratada (composta por *pellets* de fungos com microalgas). Dessa forma, maiores investigações devem ser realizadas acerca dos parâmetros que possam ter influenciado no processo de digestão anaeróbia.

Apesar das paredes celulares de microalgas e fungos possuírem semelhanças macromoleculares (HOM-DIAZ et al. 2016), diferentes relações F/A (fungo/alga) devem ser testadas. Como as microalgas são compostas por celulose, hemicelulose, pectina e glicoproteínas (WANG e EVANGELOU, 1995), e os fungos possuem quitina, glucano e manoproteínas (glicoproteínas contendo manose) (WEBSTER e WEBER, 2007). Outra verificação a ser realizada está associada às relações C/N da biomassa F/M (Fungo/micro-organismo), para impedir que ocorra o desequilíbrio das exigências de carbono e nitrogênio pelos micro-organismos no processo de digestão anaeróbia. Além disso, é fundamental uma caracterização detalhada acerca da composição físico-química da biomassa F/M.

Os efeitos da proporção de células de microalgas para esporos de fungos têm sido investigado nas águas residuais, com o objetivo de confirmar a viabilidade do processo de biofloculação para a colheita de microalgas (BHATTACHARYA, et al. 2017; CHEN et al. 2018). Esse processo pode ser uma alternativa para a concentração desses micro-organismos, para a produção de biocombustíveis de uma forma rentável. Recentemente, os parâmetros críticos e novas informações sobre técnicas de colheitas utilizando fungos, têm sido analisadas (YANG, et al. 2019), no entanto, foi verificada a necessidade de estudos que relatem os parâmetros associados à digestão anaeróbia da biomassa F/M.

Assim, com base nas presentes observações e levando em consideração outra perspectiva, se a biomassa de microalgas for utilizada como substrato para produção de enzimas, é possível utilizar o processo de digestão anaeróbia para o tratamento desse resíduo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que os processos de pré-tratamento utilizados para solubilizar as microalgas, apresentaram impactos negativos sobre a eficiência da digestão anaeróbia, com exceção da extração lipídica.

No experimento 1, estudou-se a extração lipídica como pré-tratamento. A mistura de solventes composta por clorofórmio-metanol foi mais eficiente para extração de lipídios do que a mistura de etanol-hexano, no entanto a digestão anaeróbia dos resíduos contendo clorofórmio apresentou menor produção de CH₄. Em comparação à biomassa *in natura*, o processo de extração de lipídios, utilizando a mistura de solventes de etanol-hexano, tornou a biomassa residual mais acessível às bactérias presentes no processo de digestão anaeróbia. Portanto, a fim de otimizar e melhorar a utilização da biomassa de microalgas e dos resíduos para fins energéticos, a mistura etanol-hexano destaca-se como a melhor alternativa para a produção simultânea de lipídios e CH₄.

No experimento 2, estudou-se a solubilização da biomassa de um consórcio de micro-organismos fotossintéticos, sendo, em seguida avaliada a produção de CH₄ pela melhor condição aplicada. Os níveis de solubilização investigados apresentaram um perfil crescente para as técnicas por ultrassom (0-8%), micro-ondas (1-10%) e para o pré-tratamento hidrotérmico (9-17%). O uso do pré-tratamento hidrotérmico não favoreceu a produção de CH₄, assim como a composição mineral das microalgas foi suficiente para atender as demandas nutricionais dos micro-organismos responsáveis pelo processo de digestão anaeróbia. Os resultados obtidos associados à biomassa, composta por 99% de cianobactérias, sugerem resultado promissores sem a necessidade de pré-tratamento.

No experimento 3, estudou-se o pré-tratamento biológico por enzimas de micro-organismos fúngicos. O fungo *A. niger* apresentou melhores resultados de atividade enzimática em relação à *T. aureoviride*, apresentando resultados satisfatórios de FPase ($0,103 \pm 0,012$ U/mL) e CMCase ($0,873 \pm 0,026$ U/mL). Em relação à produção de metano, o resíduo após o tratamento biológico não favoreceu a produção de CH₄. Faz-se fundamental uma caracterização detalhada acerca da composição físico-química da biomassa F/M (fungo/microalga) e seu contato com consórcio microbiano anaeróbio, para identificar as causas da possível instabilidade durante o processo.

Apesar das crescentes pesquisas sobre a digestão anaeróbia de microalgas, o tema ainda possui caráter exploratório devido à complexidade do processo que envolve diferentes micro-organismos, condições e fatores operacionais. Dessa forma, maiores investigações

devem ser realizadas acerca dos parâmetros que possam ter influenciado no processo de digestão anaeróbia das diferentes biomassas utilizadas.

REFERÊNCIAS

- ABOSHADY, A. M.; MOHAMED, Y. A.; LASHEEN T. Chemical-composition of the cell-wall in some green-algae species. **Biol Plantarum** 35, p. 629–632, 1993
- ALZATE, M. E.; MUÑOZ, R.; ROGALLA, F.; FDZ-POLANCO, F.; PÉREZ-ELVIRA, S. I. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource technology** v. 123, p. 488-494, 2012.
- ALZATE, M. E.; MUÑOZ, R.; ROGALLA, F.; FDZ-POLANCO, F.; PÉREZ, S. I. Biochemical Methane Potential of microalgae biomass after lipid extraction. **Chemical Engineering Journal**. v. 243, p. 405–410, 2014.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Environmental science and biotechnology**, v. 3, p. 117–29, 2004.
- APHA, AWWA, WPCF. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edn., American Public Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC, USA, 2012.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34. P. 755-781, 2008
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v. 12, p. 192-201, 2007.
- AYALA-PARRA, P.; LIU, Y., SIERRA-ALVAREZ, R., & FIELD, J. A. Anaerobic biodegradability of *Chlorella protothecoides* algal biomass. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 37, n. 1, p. 418-424, 2017a
- AYALA-PARRA, P.; LIU, Y.; FIELD, A. J.; SIERRA-ALVAREZ, R. Nutrient recovery and biogas generation from the anaerobic digestion of waste biomass from algal biofuel production. **Renewable Energy**. v.108, p. 410 e 416, 2017b
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207–210, 2007.
- BHATTACHARYA, A.; MATHUR, M.; KUMAR, P.; PRAJAPATI, S. K.; MALIKA, A. A rapid method for fungal assisted algal flocculation: Critical parameters & mechanism insights. **Algal Research**, v. 21, p. 42–51, 2017.
- BICUDO C.E.M. ; MENEZES M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. RIMA, São Carlos, 2005.
- BILLER, P.; ROSS, A. B.; SKILL, S. C. Investigation of the presence of an aliphatic biopolymer in cyanobacteria: Implications for kerogen formation. **Organic Geochemistry**. v.81, p. 64–9, 2015.

BLIGH, E. G. AND DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochemistry Physiology**. v. 37, p. 911-917, 1959.

BOHUTSKYI, P., BETENBAUGH, M. J. & BOUWER, E. J. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. **Bioresource Technology**, 155, 366-372, 2014.

BOHUTSKYI, P.; BOUWER, E. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs. In: Lee WJ, editor. **Adv. biofuels bioprod.** New York, NY: Springer New York, p. 873–975, 2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 557–577, 2010.

CARRERE, H.; DUMAS, C.; BATTIMELLI, A.; BATSTONE, D. J.; DELGENES, J. P., STEYER, J. P.; FERRER, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v.183, p.1-15, 2010.

CARRILLO-REYES. J.; BUITRÓN, G. Biohydrogen and methane production via a two-step process using an acid pretreated native microalgae consortium. **Bioresource Technology** 221. 324–330, 2016.

CAVINATO, C.; UGURLU, A.; GODOS, E.; KENDIR, C. GONZALEZ-FERNANDEZ. Biogas production from microalgae In: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products. 5th Floor, Cambridge, 2017.

CERVANTES, T.; LEBRERO, R.; CAVINATO, C.; MUNÓZ, R. Biogas upgrading using algal-bacterial processes. In: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts From Feedstock Cultivation to End-Products. 5th Floor, Cambridge, 2017.

CHAUDHARY, R.; KHATTAR, J. I. S.; SINGH, D. P. Growth and Lipid Production by *Desmodium subspicatus* and Potential of Lipids for Biodiesel Production. **Journal of Energy and Environmental Sustainability**. v. 4 , 2017.

CHEN, J.; LENG, L.; YE, C.; LU, Q.; ADDY, M.; WANG, M.; LIU, J.; CHEN, P.; RUAN, R.; ZHOU, W. A comparative study between fungal pellet- and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. **Bioresource Technology**. v.259, p. 181–190, 2018.

CHEN, P. H.; OSWALD, W. J. Thermochemical treatment for algal fermentation. **Environment International**, 24, 889-897, 1998.

CHIA, M., LOMBARDI, A.T., MELÃO, M.G.G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 1427-1438. 2013.

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

CHO, S.; PARK, S.; SEON, J.; YU, J.; LEE., T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. **Bioresource Technology**. v. 143, p. 330–336, 2013.

CHO, Y. T.; YOUNG, J. C.; JORDAN, J.A.; MOON H.M. Factors affecting measurement of specific methanogenic activity. **Water Science & Technology**. v. 52, p. 435–440, 2005

CHOWDHURY, R.; FRANCHETTI, M. Life cycle energy demand from algal biofuel generated from nutrients present in the dairy waste. **Sustainable production and consumption**. v.9, p. 22-27, 2017.

CÓRDOVA, O.; SANTISB, J., RUIZ-FILLIPIA., G.; ZUÑIGAA., M. E.; FERMOSO, G. M.; CHAMYA, R. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 82, p. 2806-2813, 2018.

DE SCHAMPHELAIRE, L.; VERSTRAETE, W. Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 2, p. 296-304, 2009.

DEMIRBAS, AYHAN. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, p. 3473–3480, 2011.

DEMUEZ, M., GONZALEZ-FERNANDEZ, C., BALLESTEROS, M., Algicidal microorganisms and secreted algicides: new tools to induce microalgal cell disruption. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1615–1625, 2015.

EHIMEN E.A.; HOLM-NIELSEN, J.-B.; POULSEN, M.; BOELSMAND, J. E. Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae. **Renewable Energy**. v. 50, 476-480, 2013.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G.; BIRCH, E. J.; EATON-RYE, JJ. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. **Applied Energy**. v. 88, p. 3454-3463, 2011.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G.; BIRCH, E. J.; EATON-RYE, JJ. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. **Global Change Biology Bioenergy**, n.1, p. 371-381, 2009.

FAVARO, L., ALIBARDI, L., LAVAGNOLO, M.C., CASELLA, S., BASAGLIA, M. Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. **International Journal of Hydrogen Energy**. 38, p. 11774–11779, 2013.

FLORENCIO, L.; JENIČEK, P.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G. Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 368-374, 1993.

GAIGNARD, C.; GARGOUCH, N.; DUBESSAY, P., DELATTRE, P.; PIERRE, P.; LAROCHE, C.; FENDRI, I.; ABDELKAFI, S.; MICHAUD, P. New horizons in culture and valorization of red microalgae. **Biotechnology Advances**. v.37, p. 193–222, 2019.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic digestion of algae. **Applied Microbiology**, v 5, p. 47-55, 1957.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., SIALVE, B., BERNET, N., STEYER, J.P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. **Biofuels, Bioprod. Biorefin.** v. 6, p. 205–218, 2011.

GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. **Biomass Bioenergy**. V. 40, p. 105–11, 2012a.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J.P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. **Bioresource technology**, v. 110, p. 610-616, 2012b.

GULDHE, A., SINGH, B., RAWAT, I., RAMLUKAN, K., & BUX, F. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **Fuel**, v.128, p. 46–52, 2014.

GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. Biofuel technologies: recent developments. Berlin Heidelberg: **Springer**; 2013.

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

HERNÁNDEZ D, SOLANA M, RIAÑO B, GARCÍA-GONZÁLEZ MC, BERTUCCO A. Biofuels from microalgae: lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach. **Bioresource Technology**. v. 170, p. 370–378, 2014.

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

HOICZYK, E.; HANSEL, A., Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**. v. 182:1191–1199, 2000.

HOM-DIAZ A, PASSOS F, FERRER I, VICENT T, BLÁNQUEZ P. Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. **Algal Research**. v. 19, p. 184–188, 2016.

IEA. State of Technology Review – Algae Bioenergy. **IEA Bioenergy**, 2017

IEA. Sustainable Production of Second-Generation Biofuels. Potential and perspectives in major economies and developing countries. **IEA Bioenergy**, 2010.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable Sustainable Energy Reviews**. v. 75, p. 692-709, 2017.

JASON, T.Z.N. Co-Digestion of Food Waste and Microalgae, National University of Singapore, Singapore, 2015.

JEAN-MAXIME ROUXA; HADRIEN LAMOTTEA; JEAN-LUC ACHARDB. **An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework**. *Energy Procedia* 112. p. 680 – 688, 2017.

JEGEDE, A. O. Anaerobic digestion of cyanobacteria and chlorella to produce methane for biofuel. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**. v.5, 2012.

KENDIR, E.; UGURLU, A. A comprehensive review on pretreatment of microalgae for biogas production. **International Journal of Energy Research**, p. 1-21, 2018.

KERIS-SEN, U. D., SEN, U., SOYDEMIR, G., & GUROL, M. D. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 407–413, 2014.

KEYMER, P.; RUFFELL, I.; PRATT, S.; LANT, P. High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae **Bioresource Technology**. v. 131, p. 128–133, 2013.

KIM, J., YOO, G., LEE, H., LIM, J., KIM, K., KIM, C. W., PARK, M. S. & YANG, J.-W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 31, 862-876, 2013.

KIM, J.; KANG, C. M. Increased anaerobic production of methane by co-digestion of sludge with microalgal biomass and food waste leachate, **Bioresource Technology**. 189, p. 409–412, 2015.

KLASSEN, V.; BLIFERNEZ-KLASSEN, O.; WOBBE, L.; SCHLUTER, A.; KRUSE, O.; MUSSGUG, J. H. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. **Journal of Biotechnology**. v. 234, p. 7–26, 2016.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 82, p. 1376–1392, 2018.

LAM, M. K.; TAN, I.S.; LEE, K. T. Utilizing lipid-extracted microalgae biomass residues for maltodextrin production. **Chemical Engineering Journal**. v. 235, p. 224–230, 2014.

LAURENS, L. M. L.; MARKHAM, J.; TEMPLETON, D. W.; CHRISTENSEN, E. D.; WYCHEN, S. V.; VADELIUS, E. V.; CHEN-GLASSER, M.; DONG, T.; DAVIS, R.; PIENKOS. P. T. Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. **Energy & Environmental Science**. v. 10, p. 1716-1738, 2017.

LEE, J. Y., YOO, C., JUN, S. Y., AHN, C. Y., & OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 75–77, 2010.

LIBARDI, N.; SOCCOL, C.R.; GÓES-NETO, A.; OLIVEIRA, J.; VANDENBERGHE, L.P.S. BOHUTSKYI Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v.57, p. 190-199, 2017.

LIU, X.; WANG, W.; GAO, X. B.; ZHOU, Y. J.; SHEN, R. J. 2012. Effect of thermal pretreatment on the physical and chemical properties of municipal biomass waste. **Waste Management**. v. 32, p. 249-255, 2012.

MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Algal culture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. **Bioresource Technology** 184. 236–244, 2015.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

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

MATA-ALVAREZ, J., DOSTA, J., ROMERO-GÜIZA, M. S., FONOLL, X., PECES, M. & ASTALS. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renew.Sust. Energ. Rev.** 36, 412–427, 2014.

MEDIPALLY, S. R.; YUSOFF, F. M.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. **BioMed Research International**. P. 519-513, 2015.

MENDEZ, L., MAHDY, A., TIMMERS, R.A., BALLESTEROS, M., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. **Bioresource Technology**. 149, 136–141. 2014

MENDEZ, L.; MAHDY, A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. *Chlorella vulgaris* vs cyanobacterial biomasses: Comparison in terms of biomass productivity and biogas yield. **Energy Conversion and Management**. v. 92, p. 137–142, 2015.

MENDEZ, L.; MAHDY, A.; TIMMERS, A. R., BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. **Bioresource Technology**. v. 149, p. 136–141, 2013.

METI, S. R.; AMBARISH, S.; KHAJURE, P. V. Enzymes of ammonia assimilation in fungi: an overview. **Recent Research in Science and Technology**. v. 2, p. 28-38, 2011.

MIAO, H.; LU, M.; ZHAO, M.; HUANG, Z.; REN, H.; YAN, Q.; RUAN, W. Enhancement of Taihu blue algae anaerobic digestion efficiency by natural storage. **Bioresource Technology**. v. 149, p. 359–366, 2013.

MILANO, J.; ONG, C. H.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P. K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 58, p. 180–197, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 1, p. 426-28. 1959

MUSSGNUMG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLUTER, A.; KRUSE O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, n. 150, p. 51–56, 2010.

NAGAO, N.; TAJIMA, N.; KAWAI, M.; NIWA, C.; KUROSAWA, N.; MATSUYAMA, T.; YUSOFF, F.M.; TODA, T. Maximum organic loading rate for the single-stage wet anaerobic digestion of food waste, **Bioresource Technology** 118, 210–218, 2012.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA 733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118–123, 2012.

NEVES, V. T. C.; SALES, E. A; PERELO, L. W. Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 59, p. 160–165, 2016.

OMETTO, F., QUIROGA, G., PSENICKA, P., WHITTON, R., JEFFERSON, B., VILLA, R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. **Water Research**. 65, 350–361, 2014.

PARK, S.; LI, Y. B. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste, **Bioresource Technology** 111, p. 42–48. 2012

PASSOS, F., HERNÁNDEZ-MARINÉ, M., GARCÍA, J. & FERRER, I. Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. **Water Research**, 49, 351–359, 2014b.

PASSOS, F., SOLÉ, M., GARCÍA, J. & FERRER, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. **Applied Energy**, 108, 168–175. 2013a.

PASSOS, F., UGGETTI, E., CARRÈRE, H. & FERRER, I. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. **Bioresource Technology**, 172, 403–412, 2014c.

PASSOS, F.; ASTALS, S. & FERRER, I. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. **Waste Management**. v. 34, p. 2098–2103, 2014a.

PASSOS, F.; CARRETERO, J.; FERRER, I. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. **Chemical Engineering Journal**. v. 279, p. 667–672, 2015.

PASSOS, F.; FELIX, L.; ROCHA, H., PEREIRA, J. O.; AQUINO, S. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. **Bioresource Technology**. v. 209, p. 305–312, 2016a.

PASSOS, F.; FERRER, I. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. **Water research**. v. 68, p. 364 e 373, 2015.

PASSOS, F.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Impact of low temperature on the anaerobic digestion of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 79-86, 2013b.

PASSOS, F.; HOM-DIAZ, A.; NBLANQUEZ, P.; VICENT, T.; FERRER, I. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 199, p.347–351, 2016b.

PATEL, B.; MIAO, G., IZADPANAH, A.; SHAH, N.; HELLGARDT, K. A review on hydrothermal pre-treatment technologies and environmental profiles of algal biomass processing. **Bioresource Technology**. v. 199, p. 288–299, 2016.

POLAKOVIČOVÁ, G.; KUŠNÍR, P.; NAGYOVÁ, S.; MIKULEC, J. Process Integration of Algae Production and Anaerobic Digestion. **Chemical Engineering Transactions**. v. 29, 2012.

POSADAS, E.; ALCÁNTARA, C.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; GOUVEIA, L.; GUIEYSSE, B.; NORVILL, Z.; ACIEN, F. G.; MARKOU, G.; CONGESTRIJ, R.; KOREIVIENE, J.; MUNÖZ, R. Microalgae cultivation in wastewater. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. 5th Floor, Cambridge, 2017.

PRAJAPATI, K. S.; BHATTACHARYA, A.; KUMAR, P.; MALIK, A., VIJAY, V. K. Method for simultaneous bioflocculation and pretreatment of algal biomass targeting improved methane production. **Green Chemistry**, v. 19, p. 1-31, 2016.

PRAJAPATI, S. K.; BHATTACHARYA, A.; MALIK, A.; V.K. VIJAY. Pretreatment of algal biomass using fungal crude enzymes. **Algal Research**. v. 8, p. 8–14, 2015a.

PRAJAPATI, S. K.; KAUSHIK, P.; MALIK, A.; VIJAY, V. K.; Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1408–1425, 2013.

PRAJAPATI, S. K.; MALIK, A.; VIJAY, V. K.; SREEKRISHNAND, T. R. Enhanced methane production from algal biomass through short duration enzymatic pretreatment and codigestion with carbon rich waste. **RSC Advances**. v. 5, 2015b.

PROVASOLI, L. Nutrition and ecology of protozoa and algae. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 12, n.1, p.279 – 308, 1958.

RAHEEM, A.; PRINSEN, P.; ARUN K. VUPPALADADIYAM.; MING ZHAO; RAFAEL LUQUEC. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production. **Journal of Cleaner Production**, v. 181, p. 42-59, 2018.

RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CARRERAS, N. Use of microalgae residues for biogas production **Chemical Engineering Journal**. v. 242, p. 86–95, 2014.

RAMSUNDAR, P., GULDHE, A., SINGH, P., BUX, F. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella Sorokiniana*. **Bioresource Technology**. v. 227, p. 82–92, 2016.

RAS, M.; LARDON, L.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J-P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource technology** v. 102, p. 200–206, 2011.

RASLAVIČIUS, L.; STRIŪGAS, N.; FELNERIS, M. New insights into algae factories of the future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 81, p. 643–654, 2018.

RATHA, S.K.; PRASANNA, R. Bioprospecting Microalgae as Potential Sources of Green Energy: challenges and perspectives (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**. v.48, n. 2, p. 109–125, 2012.

RODRIGUEZ, C., ALASWAD, A., MOONEY, J., PRESCOTT, T. & OLABI, A. G. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. **Fuel Processing Technology**. V. 138, p. 765-779, 2015

SAJJADI, B.; CHEN, W.; AZIZ, A.; RAMAN, A.; IBRAHIM, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 97, p. 200–232, 2018

SAKARIKA. A. M.; KORAROS, A. M. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. **Bioresource Technology**. v. 273, p. 237-243, 2019.

SANTOS, N. O.; OLIVEIRA, S. M.; ALVES, L. C.; CAMMAROTA, M. C. Methane production from marine microalgae *Isochrysis galbana*. **Bioresource technology**. v. 157, p. 60–70, 2014.

SANZ, J. L., ROJAS, P., MORATO, A., MENDEZ, L., BALLESTEROS, M., & GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Microbial communities of biomethanization digesters fed with raw and heat pre-treated microalgae biomasses. **Chemosphere**, v.168, p.1013-1021, 2017.

SARATALE, R. J.; KUMAR, G.; BANU, R.; XIA, A.; PERIYASAMY, S.; SARATALE, G. D. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**. v. 262, p. 319–332, 2018

SCHWEDE, S.; KOWALCZYK, A.; GERBER, M.; SPAN, R. Influence of different cell disruption techniques on mono digestion of algal biomass. **Bioenergy Technology**, Renewable Energy Congress. 2011.

SFORZA, E.; BARBERA, E.; GIROTTO, F.; COSSU, R.; BERTUCCO, A. Anaerobic digestion of lipid-extracted microalgae: Enhancing nutrient recovery towards a closed loop recycling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 139–146, 2017.

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 81, p. 743–755, 2018.

SIALVE, B.; NICOLAS, B.; OLIVIER, B. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 409–16, 2009.

SINGH, V.; CHAUDHARY. D. K.; MANI, I.; DHAR, P. K. Recent advances and challenges of the use of cyanobacteria towards the production of biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 60, p. 1–10, 2016.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, M.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, P.; RAMTEKE, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and Limitations **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 82, p. 2379–2386, 2018.

SUMPRASIT, N.; WAGLE, V.; GLANPRACHA, N.; ANNACHHATRE, A.P. Biodiesel and biogas recovery from *Spirulina platensis*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.119, p. 196 e 204, 2017.

SURESH, C. S.; HO N. C.; YEU-CHUN K. Improved volatile fatty acid and biomethane production from lipid removed microalgal residue (LRIAR) through pretreatment. **Bioresource Technology**. 149 p. 590–594, 2103

TAMBOLI, A.S.; WAGHMARE, P.R.; KHANDARE, R.V.; GOVINDWAR, S.P. Comparative analyses of enzymatic activity, structural study and docking of fungal cellulases. **Gene reports**. v.9, p. 54-60, 2017.

TERCERO, E. A. R.; ALIBARDIB, L.; COSSUA, R.; BERTUCCOA, A. Anaerobic Digestion of Microalgal Residues to Enhance the Energetic Profit of Biocrude Production. **Chemical engineering transactions**. v. 37, 2014.

TRINIDAD, M. B.; CARRILLO-REYES, J.; BUITRÓN, G. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. **Bioresource Technology**. v. 244, P. 100-107, 2017.

TRIVEDI, J., AILA, M., BANGWAL, D.P., KAUL, S., GARG, M.O. Algae based biorefinery – How to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 47, p. 295-307, 2015.

UTERMOHL, H. Zur vervollkommer der quantitativen phytoplankton methodic. **Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theorestische und Angewandte Limnologie** 9: 1- 38, 1958

VARGAS, G.,; DONOSO-BRAVO, A.; VERGARA, C. & RUIZ-FILIPPI, G. Assessment of microalgae and nitrifiers activity in a consortium in a continuous operation and the effect of oxygen depletion. **Electronic Journal of Biotechnology**. 23, 63–68, 2016.

VRIES, R.P. de; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.497-522, 2001.

WANG, J., EVANGELOU, V. Handbook of Plant and Crop Physiology. p. 695–717. Marcel Dekker Inc., New York, 1995.

WANG, M.; PARK, C. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge, **Biomass Bioenerg**. 80, p. 30–37, 2015.

WARD, A. J.; LEWIS, D.M.; GREEN, F.B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. **Algal Research**. v. 5, p. 204-214, 2014.

WEBSTER, J., WEBER, R.W.S. Introduction to Fungi, p. 5–7. Cambridge University Press, New York, 2007.

WILSON, C. A.; NOVAK, J. T. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. **Water research**. v. 43, p. 4489 – 4498, 2009

YANG, L.; LI, H.; WANG, Q. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. **Bioresource Technology**. v. 275, p. 35–43, 2019.

YUN, Y.; CHO, S.; JUNG, K.; KIM, M.; SHIN, H.; KIM, D. Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipidextracted microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 19256-19261, 2014.

ZHANG, B.; OGDEN, K. Recycled wastewater from anaerobic digestion of lipid extracted algae as a source of nutrients. **Fuel**, v. 210, p. 705–712, 2017.

ZHEN, G.; LU, X.; KOBAYASHI, T.; KUMAR, G.; XU, K. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. **Chemical Engineering Journal**. 299 p. 332-341, 2016.

ZHONG, W.; CHI, L.; LUO, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, Z.; WU, W. M. Enhanced methane production from Taihu Lake blue algae by anaerobic co-digestion with corn straw in continuous feed digesters, **Bioresource Technology**. 134, p. 264–270, 2013.