



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

CARLOS MURILO DE MELO FILHO

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS SUBMETIDAS
A PRÉ-TRATAMENTOS VISANDO A PRODUÇÃO DE METANO**

Recife
2017

CARLOS MURILO DE MELO FILHO

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS SUBMETIDAS
A PRÉ-TRATAMENTOS VISANDO A PRODUÇÃO DE METANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

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

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

M528d	Melo Filho, Carlos Murilo de. Digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias submetidas a pré-tratamentos visando a produção de metano / Carlos Murilo de Melo Filho. – 2017. 138 folhas, il., gráfs., tabs. Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2017. Inclui Referências. 1. Engenharia Civil. 2. Digestão anaeróbia. 3. Microalgas. 4. Pré-tratamentos. 5. Metano. I. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos. (Orientador). II. Título. UFPE 624 CDD (22. ed.) BCTG/2019-442
-------	--

CARLOS MURILO DE MELO FILHO

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS SUBMETIDAS
A PRÉ-TRATAMENTOS VISANDO A PRODUÇÃO DE METANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Aprovada em: 22/09/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Maria de Lourdes Florêncio dos Santos, Doutora (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Luiz Olinto Monteggia, Doutor (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^ª. Fabiana Lopes d'El Rei Passos, Doutora (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^ª. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa, Doutora (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter forte e me conceder inteligência emocional para que pudesse seguir em frente com esse trabalho, meu início e meu fim. Dono de toda ciência.

À minha família, minha mãe e irmã que sempre estiveram comigo nos dias bons e ruins, nas melhores e nas piores horas. Meu amor incondicional. A elas agradeço e dedico esse trabalho.

Ao meu pai (*in memoriam*), que embora já tenha partido, ainda continua vivo comigo.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de cursar esse mestrado.

À professora Lourdinha Florêncio, pela confiança depositada em mim, pela orientação, pelos carões, mas, acima de tudo, pelo grande coração que tem.

À professora Sávia Gavazza, pelas contribuições tão valiosas e por ser tão solícita sempre quando precisei.

Ao professor Mario Kato, pelos ensinamentos durante toda a experiência de mestrado.

À Luíza, pela ajuda imensa, não importando o dia ou a hora, esteve sempre disposta a esclarecer as minhas dúvidas, e me fazer entender os meus reatores.

À Andrea, Cleide e Claudiane, da pós graduação, que sempre foram extremamente atenciosas e corteses comigo.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), pela oportunidade e por ser o espaço para que esse objetivo se fizesse real.

Aos técnicos do LSA, Ronaldo, Iago e Danúbia, que me ajudaram grandiosamente e sempre foram extremamente profissionais e prestativos comigo.

À Silvia Mariana e Idayana (Ida), por serem meu braço direito e minha mente em muitos momentos. Por acreditarem em mim, me segurarem pela mão e caminharem junto comigo. Serei eternamente grato.

Ao bom e velho amigo, Marcos Sales, que desde a graduação se mostrou como um amigo indefinidamente fiel, pelas conversas, conselhos, e almoços no RU.

Aos amigos que fiz no LSA, Marcus Vinícius, Bárbara Karoline, Oucilane, Laís Mazullo e Gustavo.

Aos amigos de sempre, Antônio, Yenê, Nívea, Laís Lima, Isabella, Raíssa, Carol, Bella e Lucas, que me apoiaram sempre, me fizeram sorrir e acreditar que o dia seguinte seria melhor.

Aos amigos da AIESEC e do Clube de consultoria da UFPE.

A todos que acreditaram em mim, agradeço.

RESUMO

Microalgas e cianobactérias constituem um substrato promissor para recuperação de energia através da produção de metano via digestão anaeróbia. Entretanto, a resistência da parede celular desses micro-organismos é considerada o principal fator limitante a sua biodegradabilidade. Dessa forma, no presente estudo, mecanismos de pré-hidrólise celular foram aplicados à biomassa de microalgas e cianobactérias visando o aumento do rendimento de CH₄ por meio de testes de potencial bioquímico. Os resultados indicaram que a digestão anaeróbia de *Chlorella vulgaris*, pós extração de lipídios, alcançou um rendimento médio de CH₄ da ordem de 138 ml CH₄/g SV, correspondente a 54% do volume de 256 ml CH₄/g SV obtido pela fermentação da biomassa íntegra. Já a biodegradabilidade da biomassa fresca de *C. vulgaris* foi moderada e variou de 54 a 63%, influenciada pelas baixas relações C/N (8:1 e 11:1) e pelo clorofórmio residual da extração. Na digestão de biomassa mista de microalgas e cianobactérias, o pré-tratamento de autoclavagem (120°C; 30 min) foi aquele com maior efeito positivo sobre o rendimento final de CH₄, proporcionando um aumento de 85% com relação ao substrato controle, acumulando 285 ml CH₄/g SV. Enquanto que os mecanismos de micro-ondas (77,1 MJ/kg ST; 30 seg) e ultrassom (206 MJ/kg ST; 10 min) potencializaram a produção de CH₄ em 56% e 31%, alcançando 238 ml CH₄/g SV e 200 ml CH₄/g SV, respectivamente. A composição da parede celular da biomassa mista e os efeitos dos pré-tratamentos promoveram consideráveis parcelas biodegradáveis do substrato, correspondentes a 83%, 68% e 57% para biomassa autoclavada, irradiada por micro-ondas e ultrassonicada, respectivamente. Quando utilizou-se biomassa comercial de *Chlorella* sp., submetida a pré-tratamento por autoclavagem a 120°C por 40 minutos e pressão de 1 kgf/cm², uma solubilização de 47% da biomassa foi alcançada. O maior rendimento de CH₄ foi observado nos reatores com substrato de alga *in-natura* no meio suplementado com nutrientes, resultando em 537 ml CH₄/g SV, sendo 158% superior à biomassa controle sem pré-tratamento e sem adição de nutrientes. No que se refere à biodegradabilidade anaeróbia da biomassa comercial de *Chlorella* sp., esta variou entre 18 e 56%. Logo, o pré-tratamento por autoclavagem não teve influência significativa sobre os rendimentos finais de CH₄.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia. Microalgas. Pré-tratamentos. Metano.

ABSTRACT

Microalgae and cyanobacteria are a promising substrate for energy recovery through the production of methane via anaerobic digestion. However, the cell wall resistance of these microorganisms is considered the main limiting factor for their biodegradability. Thus, in the present study mechanisms of cellular prehydrolysis were applied to the biomass of microalgae and cyanobacteria aiming to increase the CH₄ yield by means of batch tests. The results indicated that the anaerobic digestion of lipid extracted biomass of *Chlorella vulgaris* reached an average CH₄ yield of 138 ml CH₄/g VS, corresponding to 54% of the volume of 256 ml CH₄/g VS obtained by the fermentation of the whole biomass. The biodegradability of the fresh *C. vulgaris* biomass was moderate and ranged from 54 to 63%, influenced by the low C/N ratio (8:1 and 11:1) and by the residual chloroform from the lipid extraction step. With regards to the digestion of mixed culture biomass composed of microalgae and cyanobacteria, the autoclaving pretreatment (120°C, 30 min) was the one with the greatest positive effect on the final CH₄ yield, providing an increase of 85% in relation to the control substrate, accumulating 285 ml CH₄/g VS. Meanwhile, microwave (77.1 MJ/kg TS, 30 sec) and ultrasound (206 MJ/kg TS, 10 min) enhanced CH₄ production by 56% and 31%, reaching 238 ml CH₄/g VS and 200 ml CH₄/g VS, respectively. The composition of the cell wall of the mixed culture biomass and the effects of the pre-treatments promoted considerable biodegradable portions of the substrate, corresponding to 83%, 68% and 57% for autoclaved, microwaved and ultrasonicated biomass, respectively. When commercial biomass of *Chlorella* sp., was autoclaved at 120° C for 40 minutes at a pressure of 1 kgf/cm², a solubilization of 47% was achieved. The highest CH₄ yield was observed in the reactors with untreated algae substrate in the medium supplemented with nutrients, resulting in 537 ml CH₄/g VS, being 158% superior to the digestion of control biomass without pre-treatment and with no nutrients added. As regards the anaerobic biodegradability of the commercial biomass of *Chlorella* sp., it varied between 18 and 56%. Therefore, thermal pretreatment by autoclaving had no significant influence on the final yields of CH₄.

Keywords: Anaerobic digestion. Microalgae. Pre-treatments. Methane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Células de microalgas e cianobactérias.....	20
Figura 2 -	Mecanismo de remoção de DBO e interação de bactérias com algas no tratamento de águas residuárias.....	26
Figura 3 -	Cultivo de microalgas em sistema de lagoas abertas.....	27
Figura 4 -	Cultivo de microalgas em fotobiorreatores tubulares na unidade de pesquisa (AlgaePARC) da Universidade de Wageningen – Holanda.....	28
Figura 5 -	Mapa global do potencial de produção de lipídios a partir de microalgas.....	31
Figura 6 -	Recuperação de nutrientes para um ciclo fechado de produção de energia a partir de biomassa microalgal.....	32
Figura 7 -	Representação esquemática da digestão anaeróbia de Biomassa de algas com possíveis pontos de inibição.....	35
Figura 8 -	Rendimento teórico de metano a partir de proteínas, carboidratos e lipídios presentes em várias espécies de algas calculadas de acordo com Angelidaki e Sanders (2004)	38
Figura 9 -	Rendimento acumulado de CH ₄ a partir digestão anaeróbia da biomassa de Rhizoclonium submetida a pré-tratamento enzimático.....	56
Figura 10 -	Ensaio de biodegradabilidade metanogênica de biomassa de microalgas e cianobactérias.....	60
Figura 11 -	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobiorreatores.....	67
Figura 12 -	Extração de lipídios da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> utilizando o método de extração Soxhlet.....	68
Figura 13 -	Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade metanogênica da biomassa <i>in-natura</i> e residual de <i>Chlorella vulgaris</i>	69
Figura 14 -	Imagem de satélite do Açude de Apipucos.....	70
Figura 15 -	Ponto de coleta da biomassa mista de microalgas e cianobactérias.....	71

Figura 16 - Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade metanogênica de biomassa mista de microalgas e cianobactérias.....	75
Figura 17 - Biomassa comercial liofilizada de <i>Chlorella</i> sp.....	76
Figura 18 - Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade metanogênica de <i>Chlorella</i> sp.....	78
Figura 19 - Aparato experimental para monitoramento da produção diária de CH ₄	78
Figura 20 - Células de <i>Chlorella vulgaris</i> <i>in natura</i> e pós extração de lipídios visualizadas em microscópio óptico (400x)	81
Figura 21 - Rendimento de CH ₄ na digestão anaeróbia de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> com e sem extração de lipídios.....	83
Figura 22 - Produção acumulada de CH ₄ na digestão anaeróbia de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> com e sem extração de lipídios (S/l: 0,5)	84
Figura 23 - Percentual de biodegradabilidade da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> nos ensaios de digestão	85
Figura 24 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento via ultrassom	91
Figura 25 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento via micro-ondas	92
Figura 26 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento de autoclavagem.....	93
Figura 27 - Células de biomassa mista de microalgas e cianobactérias visualizadas em microscópio óptico (400x)	96
Figura 28 - Rendimento de CH ₄ na digestão anaeróbia de biomassa mista de microalgas e cianobactérias <i>in natura</i> e pós tratamentos	98
Figura 29 - Produção acumulada de CH ₄ na digestão anaeróbia de biomassa mista de microalgas e cianobactérias <i>in natura</i> e pós tratamentos (S/l: 0,5)	99
Figura 30 - Biodegradabilidade anaeróbia de biomassa mista submetida a pré-tratamentos de ultrassom, micro-ondas e autoclavagem	102

Figura 31 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento de autoclavagem	106
Figura 32 - Células de <i>Chlorella</i> sp. visualizadas em microscópio óptico (400x)	108
Figura 33 - Rendimento de CH ₄ na digestão anaeróbia de biomassa comercial <i>Chlorella</i> sp	110
Figura 34 - Produção acumulada de CH ₄ na digestão anaeróbia de biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp. (S/l: 0.5)	110
Figura 35 - Biodegradabilidade anaeróbia da biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classes de microalgas e número aproximado de espécies conhecidas.....	21
Tabela 2 -	Conteúdo de proteínas, lipídios e carboidratos de células autotróficas e heterotróficas de <i>Chlorella protothecoids</i>	22
Tabela 3 -	Compostos de alto valor agregado produzidos por algas.....	23
Tabela 4 -	Comparação do rendimento de óleo a partir de microalgas e matérias-primas habitualmente cultivadas para produção de biocombustível.....	29
Tabela 5 -	Pré-tratamentos aplicados à biomassa de microalgas e cianobactérias e respectivos rendimentos de CH ₄	46
Tabela 6 -	Características do lodo.....	61
Tabela 7 -	Parâmetros e respectivos métodos analíticos realizados na caracterização da biomassa de microalgas e cianobactérias.....	62
Tabela 8 -	Parâmetros e respectivos métodos analíticos realizados na caracterização do efluente da digestão.....	63
Tabela 9 -	Parâmetros físico-químicos da água do Açude de Apipucos.....	71
Tabela 10 -	Condições dos ensaios de otimização do pré-tratamento ultrassônico de biomassa mista.....	72
Tabela 11 -	Condições dos ensaios de otimização do pré-tratamento de micro-ondas de biomassa mista.....	73
Tabela 12 -	Planejamento fatorial 2 ² para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem.....	73
Tabela 13 -	Condições finais dos mecanismos de pré-hidrólise celular para biomassa mista.....	74
Tabela 14 -	Concentração de reagentes em solução de nutrientes.....	76
Tabela 15 -	Planejamento fatorial 2 ² para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem.....	77
Tabela 16 -	Caracterização da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i>	80
Tabela 17 -	Caracterização do efluente da digestão de <i>C. vulgaris</i>	88
Tabela 18 -	Condições do pré-tratamento ultrassônico aplicado à biomassa mista e variáveis resposta.....	90

Tabela 19 -	Condições do pré-tratamento de micro-ondas aplicado à biomassa mista e variáveis resposta.....	92
Tabela 20 -	Planejamento fatorial 2 ² para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem de biomassa mista.....	93
Tabela 21 -	Condições finais dos mecanismos de pré-hidrólise celular para biomassa mista.....	94
Tabela 22 -	Microalgas e cianobactérias identificadas no Açude de Apipucos.....	94
Tabela 23 -	Caracterização da biomassa mista de microalgas e cianobactérias.....	95
Tabela 24 -	Caracterização do efluente da digestão de biomassa mista.....	104
Tabela 25 -	Planejamento fatorial 2 ² para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem de biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp.....	105
Tabela 26 -	Caracterização da suspensão de biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp. <i>in-natura</i> e pré-tratada.....	107
Tabela 27-	Caracterização do efluente da digestão de biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp.....	115
Tabela 28 -	Valores médios de alcalinidade total, AGV e relação AGV/ALC.....	116
Tabela 29 -	Rendimento energético obtido a partir da digestão da biomassa <i>in natura</i> e residual de <i>Chlorella vulgaris</i>	117
Tabela 30 -	Rendimento energético obtido a partir da digestão da biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp.....	118
Tabela 31 -	Viabilidade energética dos pré-tratamentos com base no rendimento de CH ₄ obtido a partir da digestão da biomassa mista.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
BCAE	Reator com biomassa de <i>C. vulgaris</i> antes da extração
BCPE	Reator com biomassa de <i>C. vulgaris</i> pós-extração
BMIN	Reator com biomassa mista <i>in natura</i>
BMAC	Reator com biomassa mista pós-autoclavagem
BMMO	Reator com biomassa mista pós-micro-ondas
BMUS	Reator com biomassa pós ultrassom
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CE	Condutividade Elétrica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO_b	Demanda Química de Oxigênio bruta
DQO_s	Demanda Química de Oxigênio solúvel
CH₄	Metano
CO₂	Gás carbônico
HTAP	Hidrólise Térmica de Alta Pressão
INCN	Reator com biomassa <i>in natura</i> de <i>Chlorella</i> sp. com nutrientes
INSN	Reator com biomassa <i>in natura</i> de <i>Chlorella</i> sp. sem nutrientes
LAT	Lagoa de Alta Taxa
NO₃⁻	Nitrato
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
O₂	Oxigênio
PEM	Potencial Estequiométrico de Metano
PO₄³⁻	Fosfato
PTCN	Reator com biomassa pré-tratada de <i>Chlorella</i> sp. com nutrientes
PTSN	Reator com biomassa pré-tratada de <i>Chlorella</i> sp. sem nutrientes
SO₄²⁻	Sulfato
SF	Sólidos Fixos
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
TCO	Taxa de Carregamento Orgânico
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Microalgas e Cianobactérias	20
3.1.1	Composição	20
3.1.2	Aplicações	23
3.1.3	Potencial para produção de biocombustíveis	27
3.2	Digestão anaeróbia de biomassa de microalgas e cianobactérias.....	33
3.2.1	Carga orgânica e tempo de detenção	39
3.2.2	Relação Substrato/Inóculo	40
3.2.3	Temperatura e pH	40
3.2.4	Relação C/N	41
3.2.5	Nitrogênio amoniacal.....	42
3.2.6	Salinidade.....	42
3.2.7	Outros fatores de influência na digestão anaeróbia	43
3.3	Biodegradabilidade da parede celular e pré-tratamentos.....	44
3.3.1	Pré-tratamento térmico.....	51
3.3.2	Pré-tratamento mecânico	53
3.3.3	Pré-tratamento biológico	55
3.3.4	Pré-tratamento químico	57
3.4	Perspectivas Futuras	58
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1	Metodologia comum aos 3 experimentos	600
4.1.1	Inóculo.....	61

4.1.2	Determinação do grau de solubilização.....	61
4.1.3	Caracterização do substrato.....	61
4.1.4	Potencial Estequiométrico de Metano (PEM)	63
4.1.5	Medição da produção de metano	64
4.1.6	Biodegradabilidade.....	64
4.1.7	Viabilidade energética	65
4.2	Experimento 1: Digestão de biomassa fresca de <i>Chlorella vulgaris</i>	66
4.2.1	Substrato	66
4.2.2	Extração de lipídios	68
4.2.3	Instalação experimental.....	68
4.3	Experimento 2: Digestão de biomassa mista de cianobactérias e microalgas.....	69
4.3.1	Substrato	69
4.3.2	Otimização dos pré-tratamentos	71
4.3.3	Condições finais dos pré-tratamentos	73
4.3.4	Instalação experimental.....	74
4.4	Experimento 3: Digestão de biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp.....	75
4.4.1	Substrato	75
4.4.2	Solução de nutrientes.....	76
4.4.3	Otimização do pré-tratamento	77
4.4.4	Pré-tratamento térmico de autoclavagem.....	77
4.4.5	Instalação experimental.....	77
5.1	Resultados e discussão – experimento 1	79
5.1.1	Caracterização da biomassa e efeito do processo de extração de lipídios	79
5.1.2	Produção de CH ₄ e biodegradabilidade do substrato.....	82
5.1.3	Efluente da digestão.....	87
5.2	Resultados e discussão – experimento 2	89

5.2.1	Otimização dos pré-tratamentos	89
5.2.2	Caracterização da biomassa mista e efeito dos pré-tratamentos.....	94
5.2.3	Produção de CH ₄ e biodegradabilidade do substrato.....	98
5.2.4	Efluente da digestão.....	103
5.3	Resultados e discussão – experimento 3	105
5.3.1	Otimização do pré-tratamento hidrotérmico	105
5.3.2	Caracterização da biomassa comercial de <i>Chlorella</i> sp. e efeito do pré- tratamento hidrotérmico	106
5.3.3	Produção de Metano e Biodegradabilidade.....	109
5.3.4	Efluente da Digestão	115
5.4	Viabilidade energética.....	116
6	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS.....	123

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, microalgas e cianobactérias vem recebendo especial atenção por despontarem como matéria-prima potencial para estruturar a cadeia de combustíveis da terceira geração (MUSSGUG *et al.* 2010). Por serem altamente ricas energeticamente em termos de composição celular, abundante em proteínas, lipídios e carboidratos, e terem capacidade de originar grandes quantidades de biomassa mais eficientemente que culturas terrestres, as microalgas são empregadas na produção de biodiesel, bioetanol, biohidrogênio e biometano (SHILTON e GUIEYSSE, 2016).

A biomassa proveniente do processo de extração de lipídios para produção de biodiesel pode ser convertida, entre outros produtos, a metano através da digestão anaeróbia (YANG *et al.* 2010; SINGH e OLSEN, 2011, ZHENG *et al.* 2012; RASHID *et al.* 2013). A digestão anaeróbia figura como a solução mais viável e promissora de destino da biomassa residual pós extração, pois, além da produção de metano como uma via de recuperação energética, permite a obtenção de uma fase líquida em que os nutrientes são remineralizados (SIALVE *et al.* 2009; WARD *et al.* 2014; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2015; XIA *et al.* 2016).

Outra justificativa para obtenção de energia a partir de microalgas, consiste na produção de metano a partir de microalgas inteiras. Nesse processo, ocorre a fermentação metanogênica de todas as macromoléculas que fazem parte da estrutura microalgal, isto é lipídios, proteínas e carboidratos, sem considerar a produção de biodiesel (DE SCHAMPHELAIRE e VERSTRAETE, 2009; SIALVE *et al.* 2009; DOUSKOVA *et al.* 2010; ZAMALLOA *et al.* 2011, MENDEZ *et al.* 2014).

Alguns outros fatores, além da composição bioquímica da célula, têm demonstrado uma interferência mais significativa no potencial de produção de metano a partir da biomassa de microalgas e cianobactérias, tais como: concentração de substrato, tempo de retenção, temperatura, pH, presença de inibidores da metanogênese e, principalmente, a biodegradabilidade da parede celular (HARUN *et al.*; 2010; MUSSGUG *et al.* 2010; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2012; JONES e MAYFIELD, 2012; SAHARAN *et al.* 2013, WARD *et al.* 2014).

Embora o potencial de produção de CH_4 seja altamente dependente da composição bioquímica das microalgas, a resistência da parede celular é considerada o fator limitante mais significativo ao seu processo de digestão (SIALVE *et al.* 2009). Células de microalgas apresentam parede celular rígida constituída, principalmente, de celulose, hemicelulose e biopolímeros, moléculas extremamente resistentes ao ataque enzimático bacteriano (MUSSGNUNG *et al.* 2010; RAS *et al.* 2011). Portanto, a cinética da digestão anaeróbia é altamente dependente da composição bioquímica e da biodegradabilidade da parede celular da espécie de microalgas (SIALVE *et al.* 2009).

Por outro lado, estudos têm demonstrado uma correlação linear entre a solubilização de frações orgânicas particuladas e moléculas orgânicas da biomassa de microalgas e cianobactérias facilitando o processo de digestão pelos micro-organismos anaeróbios e aumentando o rendimento final de metano a partir da aplicação de pré-tratamentos para lise celular (MENDEZ *et al.* 2013; PASSOS *et al.* 2013a; PASSOS *et al.* 2013b; MENDEZ *et al.* 2014).

Embora uma etapa prévia de tratamento torne o processo mais caro e complexo, ela pode tornar o procedimento de digestão mais eficaz e reduzir o custo total para que seja possível obter um balanço energético positivo em comparação com a biomassa bruta (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Nesse sentido, este estudo avaliou a influência de diferentes mecanismos de pré hidrólise celular aplicados à biomassa de microalgas e cianobactérias na solubilização e biodegradabilidade do substrato, bem como no potencial de produção de metano.

2 OBJETIVOS

Este item visa apresentar o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produção de metano a partir da digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias submetidas a mecanismos de pré-hidrólise celular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho das técnicas de pré-tratamento na solubilização de biomassa de microalgas e cianobactérias;
- Quantificar diretamente o rendimento de metano e avaliar a biodegradabilidade anaeróbia de biomassa de microalgas pré-tratada e sem pré-tratamento;
- Investigar os efeitos da suplementação nutricional sobre o consórcio anaeróbio na digestão de biomassa comercial de *Chlorella* sp.;
- Avaliar a composição do efluente dos ensaios de digestão e seu potencial na recuperação de nutrientes para cultivo de microalgas;
- Avaliar a viabilidade energética do processo de digestão a partir da aplicação de mecanismos de pré-tratamento para lise celular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, será apresentada a base conceitual que norteia o trabalho. O item 3.1 trata da fundamentação teórica acerca das microalgas e cianobactérias, características, aplicações e potencial para produção de biocombustíveis.

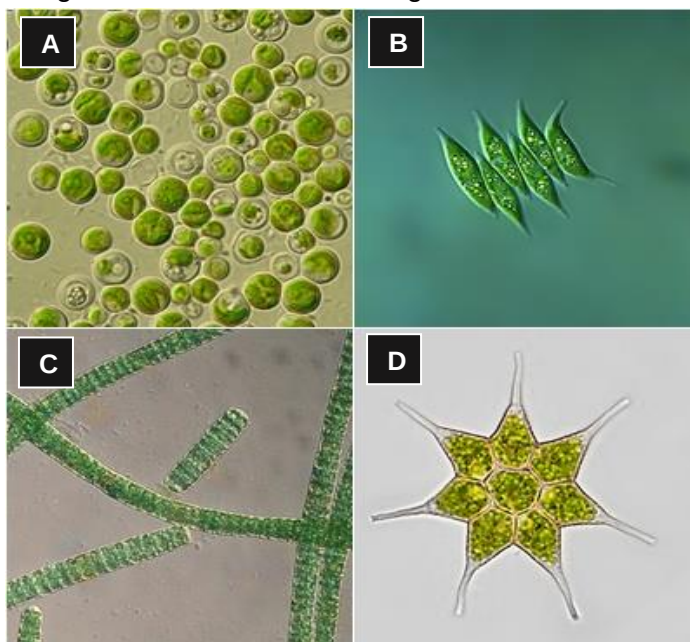
3.1 Microalgas e Cianobactérias

Este item apresenta a definição de microalgas e cianobactérias, bem como sua composição físico-química.

3.1.1 Composição

As microalgas são micro-organismos unicelulares, ou de estrutura multicelular simples, fotossintéticos, capazes de converter energia solar em energia química sob a forma de biomassa. Esses seres microscópicos, constituídos de fitoplâncton, tem a capacidade de produzir matéria orgânica através da absorção de CO₂ e liberação de O₂ e água, na presença de radiação luminosa, e são responsáveis por produzir cerca de 2/3 de todo oxigênio primário do planeta (CHISTI, 2007; MATA *et al.* 2010; DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011).

Figura 1 - Células de microalgas e cianobactérias



Fonte: algaebase.org (2017).

1A: *Chlorella vulgaris*; 1B: *Scenedesmus* sp.; 1C: *Spirulina* sp.; 1D: *Pediastrum simplex*

Existem centenas de milhares de representantes do grupo de espécies microalgais, e a classificação das diversas genealogias das espécies existentes varia de acordo com as características morfológicas, tipos de pigmentos fotossintéticos e a composição bioquímica dos produtos resultantes do seu metabolismo. Em termos de abundância e aplicação prática, as classes que assumem maior importância são as algas verdes (*Chlorophyceae*), algas douradas (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*). As cianobactérias (*Cyanophyceae*), também conhecidas como algas azuis-verdes, são algas procariotas também incluídas no conceito que abrange todas as microalgas passíveis de algum tipo de aplicação comercial (BECKER *et al.* 2007; DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011).

Tabela 1 - Classes de microalgas e número aproximado de espécies conhecidas

Classes de Microalgas	Número aproximado de espécies conhecidas
Diatomáceas (<i>Bacillariophyceae</i>)	10^5
Algas verdes (<i>Chlorophyceae</i>)	8×10^3
Algas azuis-verdes (<i>Cyanophyceae</i>)	2×10^3
Algas douradas (<i>Chrysophyceae</i>)	10^3

Fonte: Adaptado de Khan *et al.* (2009).

As *Cyanophyceae* têm a capacidade de absorver energia luminosa por meio de ficobiliproteínas, desenvolvendo-se, majoritariamente, em água neutra ou alcalina. Elevadas temperaturas podem promover a estratificação térmica e estabilizar a coluna de água, levando à eutrofização do corpo hídrico como consequência das altas concentrações de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, estimulando a formação de florações de algas (VOLLENWEIDER *et al.* 1971).

A composição bioquímica das células de microalgas e cianobactérias é essencialmente uma combinação de 3 constituintes fundamentais: 1. Carboidratos, com função estrutural e metabólica; 2. Proteínas, com função estrutural e metabólica, acrescentando-se o papel das enzimas como catalisadores das reações metabólicas; 3. Lipídios, que representam também, além da função estrutural, uma fonte de armazenamento de energia (WILLIAMS & LAURENS, 2010). As concentrações de proteínas e carboidratos são altas em diversas espécies de microalgas, até 50-70% da sua massa seca (CHISTI, 2007; CHEN *et al.* 2011).

A formação de cada composto no interior da célula é regulada por complexos mecanismos metabólicos, os quais podem apresentar propriedades de caráter autotrófico, mixotrófico ou heterotrófico. No metabolismo autotrófico, a energia é obtida através da absorção de energia luminosa e consumo de CO₂ inorgânico, enquanto que no metabolismo heterotrófico, as microalgas utilizam componentes orgânicos como fonte de energia e não a energia luminosa. Já o metabolismo mixotrófico é caracterizado pela obtenção de energia por ambas fontes de carbono, orgânica e inorgânica, na presença de luz e calor.

Embora a composição bioquímica da célula seja modificada de acordo com a espécie de microalga cultivada, este não é o único fator limitante à diversidade da sua estrutura celular. Estudos realizados por Xu *et al.* (2006) descobriram que as células de *Chlorella protothecoids* obtiveram diferentes concentrações de componentes celulares quando cultivadas em diferentes condições metabólicas: autotróficas e heterotróficas. Utilizando pó de milho hidrolisado em vez de glicose como fonte de carbono, a cultura de *Chlorella protothecoids* alcançou quase 4 vezes mais lipídios em sua composição celular que quando cultivada em meio autotrófico, por exemplo (Tabela 2).

Tabela 2 - Conteúdo de proteínas, lipídios e carboidratos de células autotróficas e heterotróficas de *Chlorella protothecoids*

Componente (%)	Metabolismo Autotrófico	Metabolismo Heterotrófico
Proteínas	52,64 ± 0,26	10, 28 ± 0,10
Lipídios	14,57 ± 0,16	55,20 ± 0,28
Carboidratos	10,62 ± 0,14	15,43 ± 0,17

Fonte: Adaptado de Xu *et al.* (2006).

Além de lipídios, proteínas, carboidratos, enzimas e fibras, muitas vitaminas (A, C, B1, B2 e B6, por exemplo) e minerais (niacina, iodo, potássio, ferro, magnésio e cálcio) podem ser amplamente encontrados em algas microscópicas. Elas ainda são

capazes de sintetizar importantes metabólitos bioativos, como ácidos graxos poliinsaturados (fonte de ômega-3 e ômega-6) e carotenoides, compostos de grande interesse comercial (CARDOZO *et al.* 2007; PRIYADARSHANI e RATH, 2012). Diversas espécies podem acumular grandes concentrações de β -caroteno, astaxantina ou cantaxantina, os quais têm uma ampla aplicação como corantes naturais e antioxidantes (BAKER e GUNTER, 2004; PULZ e GROSS, 2004).

Tabela 3 – Compostos de alto valor agregado produzidos por algas

Compostos	Aplicações	Exemplos
Ácidos graxos	Nutracêutica	Ácido eicosapentaenoico (EPA)
Esteróis	Nutracêutica, Aquicultura	Colesta-4-em-3 β -ol
Carotenoides	Nutracêutica, Aquicultura	β -caroteno, Astaxantina
Ficocolóides	Indústria alimentícia	Agar, Carragenana, Alginato
Lectinas	Ciência médicas	
Aminoácidos tipo micosporina	Produtos de uso pessoal (Protetor solar)	Palitina, Astirina
Compostos halogenados	Indústria farmacêutica	Ácidos graxos bromados
Poliquetídeos	Indústria farmacêutica	Anfotericina

Fonte: Adaptado de Cardozo *et al.* (2007).

3.1.2 Aplicações

O início do uso de microalgas remonta de 2000 anos pelos chineses, que se alimentavam de *Nordoc* para sobreviver durante a fome. No entanto, a produção de microalgas em escala técnica, como fonte de baixo custo de proteína, em substituição as de origem animal, só foi inicialmente desenvolvida por pesquisadores alemães durante a segunda guerra mundial (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006). Ainda na metade do século XX, as investigações de caráter biotecnológico sobre microalgas começaram a ser realizadas, conforme descobertas sobre a viabilidade

econômica, nutricional e ambiental desses micro-organismos (PRIYADARSHANI e RATH, 2012).

Hoje, existem diversas aplicações de microalgas, as quais podem ser utilizadas tanto para aumentar o valor nutricional de alguns alimentos para alimentação humana quanto para alimentação animal, além de desempenharem um papel fundamental na aquicultura, e poderem ser incorporadas também na indústria farmacêutica, de cosméticos e de produção de energia, dada sua ampla gama de metabólitos (PRIYADARSHANI e RATH, 2012). O potencial que as microalgas têm de duplicar sua biomassa em um período de 24 horas, apresentando rápido crescimento, justifica uma das suas principais vantagens (CHISTI, 2007).

Spirulina platensis, espécie de cianobactéria multicelular filamentosa não-produtora de toxinas (CIFERRI, 1983), possui grande importância comercial, principalmente em função das suas características nutricionais (VONSHAK; RICHMOND, 1988). Contabiliza-se uma produção mundial de cerca de 3000 toneladas/ano de *Spirulina* sp. (SPOLAORE *et al.* 2006).

Além de *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., e *Scenedesmus* sp. são as espécies de microalgas que representam o maior volume de aplicações comerciais, principalmente para alimentação humana em países asiáticos (SPOLAORE *et al.* 2006; PRIYADARSHANI e RATH, 2012). Em diversas aldeias da África, por exemplo, microalgas são filtradas de lagos, secas e incorporadas a um tipo de farinha, tornando-se uma importante fonte alimentar nutricional (OCEAN DROP, 2016).

No Brasil, já existem pelo menos 4 empresas produzindo microalgas: duas no Nordeste, com foco em nutrição humana e animal, e outras duas no interior de São Paulo, atendendo indústrias de cosméticos e também de rações, além de possuírem projetos para tratamento de efluentes (BRASIL, 2017).

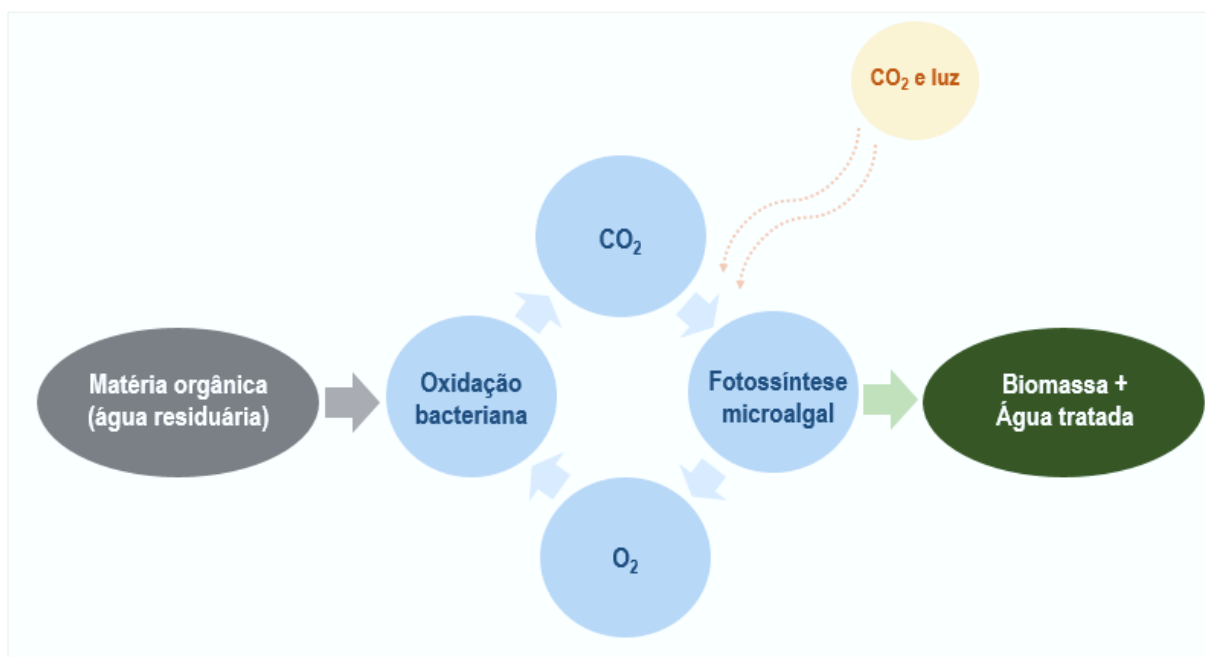
Microalgas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes, biofixação de dióxido de carbono (CO₂), bioindicadores de detecção de nutrientes e compostos tóxicos, biofertilizantes na agricultura, na remoção de nutrientes e metais pesados, na

produção de biodiesel, biometano e biohidrogênio (MONTEGGIA, 2001; DERNER *et al.* 2006; RADMANN *et al.* 2011; VARFOLOMEEV e WASSERMAN, 2011).

Efeitos positivos foram observados na fixação biológica de CO₂ por *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina* sp. por Radmann *et al.* (2011). Nesse estudo, a utilização de gás de combustão oriundo de uma usina termelétrica incrementou em 35% a produção de biomassa ao final do cultivo de *Spirulina* sp., com redução de 24,2% da concentração de CO₂ do gás de combustão, sendo biofixado cerca de 6% do CO₂ em função do crescimento das espécies. Os resultados indicam que microalgas podem ser cultivadas em usinas de produção de energia para biofixar o CO₂ proveniente do gás da queima do carvão e contribuir para redução do aquecimento global.

Microalgas ainda podem ser empregadas com sucesso no tratamento de efluentes. Mezzomo *et al.* (2010) utilizaram efluente de suinocultura, rico em fósforo e nitrogênio inorgânicos, para a produção de biomassa de *Spirulina platensis*, e verificaram que essa cultura demonstrou alta eficiência na remoção de DQO e fósforo, além de proporcionar alto rendimento de biomassa. Nutrientes ainda podem ser aproveitados do efluente e a biomassa de microalgas coletada pode ser aproveitada comercialmente em diversos segmentos (MALLICK, 2002; MUNHOZ e GUIEYSSE, 2006).

Figura 2 - Mecanismo de remoção de DBO e interação de bactérias com algas no tratamento de águas residuárias



Fonte: Adaptado de Rawat *et al.* (2011).

Wang *et al.* (2011) constatou que *Neochloris oleoabundans* foi capaz de remover nitrogênio e fósforo presentes em amostras de efluentes secundários com concentrações de 218 mg N-NO₃/L e 47 mg P- PO₄³⁻, a taxas de 43.7 mg N/L/dia e 9.4 mg P/L/dia, respectivamente. Já Nascimento (2000) relatou uma eficiência de 70-98% de remoção de coliformes fecais, e de 39 e 43% na remoção de N e P, respectivamente, no tratamento de efluentes provenientes de reator UASB em lagoas de alta taxa no cultivo de microalgas.

Dal Magro *et al.* (2013) alcançaram até 60% e 70% de remoção de Cromo (IV) e DQO, respectivamente, tratando efluente rico em metais tóxicos, utilizando biomassa ativa de *Spirulina platensis*. Microalgas possuem destaque dentre os micro-organismos utilizados no processo de biossorção devido a sua capacidade de retenção e imobilização de metais (DOSCHI *et al.* 2007). Recentemente, pesquisadores australianos foram capazes de remover, com eficiência, Cobalto, Níquel e Manganês da água da barragem de rejeitos de Queensland Nickel, através do cultivo de algas microscópicas, as quais apresentaram, sobretudo, grande potencial de conversão da sua biomassa a biocombustível, devido alto teor de

carboidratos, da ordem de 40%, exibido em sua composição (JCU AUSTRALIA, 2017).

3.1.3 Potencial para produção de biocombustíveis

Microalgas e cianobactérias oferecem uma matéria-prima alternativa promissora para a produção de biocombustíveis da terceira geração, uma vez que apresentam rendimento elevado de produção e podem utilizar áreas de terra que não são viáveis à produção agrícola, como desertos, lagos e oceanos, não representando assim competição por área para o cultivo de alimentos (COLLET *et al.* 2011; MUSSGNUG *et al.* 2010; STEPHENS *et al.* 2010).

Os sistemas mais utilizados no cultivo de microalgas para produção de biocombustíveis são os sistemas de lagoas abertas, fotobiorreatores e sistemas híbridos (JANKOWSKA *et al.* 2017). Os sistemas de lagoas abertas (*open ponds*) são reatores abertos para atmosfera, e os tipos mais usuais são as *Raceway Ponds* (HARUN *et al.* 2010; ZHAO *et al.* 2014) e as Lagoas de Alta Taxa (LAT) utilizadas no tratamento de águas residuárias (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006; PASSOS *et al.* 2014a). Nesse sistema, a concentração de biomassa algal é relativamente baixa, cerca de 10-25 g de matéria seca de biomassa de algas por dia por m² (HARUN *et al.* 2010; SATYANARAYANA *et al.* 2011).

Figura 3 - Cultivo de microalgas em sistema de lagoas abertas



Fonte: Pacific Northwest National Laboratory, EUA (2013)

O segundo método mais comumente utilizado para o cultivo de microalgas são os fotobiorreatores (PBRs), ou sistemas fechados. Os tipos empregados com maior frequência são os modelos tubulares, flat-tank, coluna de bolha e serpentina (RAS *et al.* 2011; ZAMALLOA *et al.* 2012), e a sua principal vantagem é o controle sobre o crescimento de microalgas, proporcionando alto rendimento de biomassa (SAHARAN *et al.* 2013).

Figura 4 - Cultivo de microalgas em fotobiorreatores tubulares na unidade de pesquisa (AlgaePARC) da Universidade de Wageningen – Holanda



Fonte: AlgaePARC Research, Holanda (2014)

Já o sistema híbrido é uma combinação do sistema aberto e fechado, onde o fotobiorreator cultiva espécies pré-selecionadas, que subsequentemente são inoculadas em sistemas abertos, como descrito por Zhao *et al.* (2014).

De acordo com Wang *et al.* (2008), algas microscópicas apresentam eficiência 50 vezes superior às plantas em termos de fixação de CO₂. Assim, elas podem fixar quase 2 toneladas de CO₂ por tonelada de microalgas produzidas, como descrito por CHISTI (2007). O biodiesel produzido a partir de microalgas permite o estabelecimento de um ciclo fechado de carbono, e pode ser considerado o único combustível renovável com potencial de substituir inteiramente a cadeia derivada do

petróleo (cerca de 40 bilhões de litros por ano) sem afetar o fornecimento de alimentos ou outras commodities agrícolas (CHISTI, 2008).

Dada sua alta concentração de lipídios e taxa de crescimento bastante superior às matérias-primas habitualmente cultivadas para produção de biocombustíveis, o uso de microalgas para fins comerciais apresenta-se, como sendo bastante viável (Singh e Gu, 2010). Costa e Moraes (2011) relataram através de estudos realizados com *Chlorella protothecoids* e *Microcystis aeruginose* que o biodiesel produzido a partir desses micro-organismos fotossintetizantes apresenta alto poder calorífico (cerca de 30 MJ/kg) e baixa viscosidade.

O rendimento de óleo extraído de microalgas é superior à produtividade das melhores culturas oleaginosas, chegando a produzir cerca de 10-100 vezes mais que as culturas frequentemente empregadas na produção de biodiesel. Além do mais, apresentam ciclos de cultivo que duram de 3 a 5 dias, sendo definitivamente mais curtos que culturas vegetais ricas em lipídios, as quais apresentam ciclos que variam de 3 meses a 3 anos de extensão (CHISTI, 2007; DERMIBAS, 2011).

Tabela 4 - Comparação do rendimento de óleo a partir de microalgas e matérias-primas habitualmente cultivadas para produção de biocombustível

Cultura	Rendimento de óleo (L/hectare)
Microalga ^a	136.900
Microalga ^b	58.700
Palma	5.950
Coco	2.689
Pinhão-manso	1.892
Canola	1.190
Soja	446
Milho	172

^a70% de óleo por peso de biomassa seca; ^b 30% de óleo por peso de biomassa seca
Fonte: Adaptado de Chisti, (2007).

As algas utilizadas na produção de biodiesel são, majoritariamente, algas verdes unicelulares aquáticas (*Chlorophyceae*). Espécies como *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Botryococcus*, *Chlorella* e *Dunaliella* são

reconhecidas por suas altas taxas de crescimento e altas densidades populacionais. Em condições favoráveis, elas podem duplicar o peso de sua biomassa em menos de 24 horas, à medida que rendem altos teores de lipídios, geralmente acima de 50% da sua composição (Demirbas e Demirbas, 2010).

O teor de óleo de algumas espécies de microalgas pode exceder 80% do peso seco da sua biomassa. Este alto rendimento é ideal para agricultura intensiva e representa uma excelente fonte de produção de biodiesel (GHADIRYANFAR, 2016).

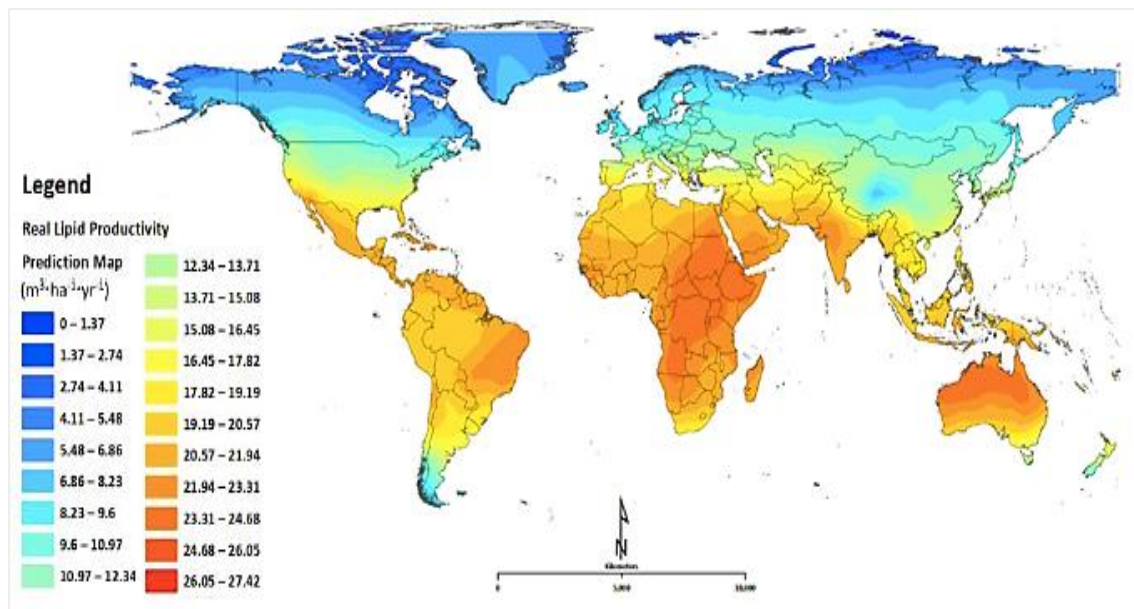
Em contrapartida, o óleo obtido a partir de microalgas possui altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, quando comparado com outras culturas oleaginosas, os quais permitem a oxidação durante o armazenamento, limitando a utilização do óleo. As desvantagens ainda incluem: altos custos de produção, recuperação e beneficiamento da biomassa para transformação em biocombustível e elevados volumes de água demandados para o cultivo (MATA *et al.* 2010; GONZÁLEZ-DELGADO e KAFAROV, 2011; AHMAD *et al.* 2012).

Todavia, o potencial de cianobactérias fotossintéticas e microalgas para produzir biocombustíveis é altamente promissor em inúmeros países, uma vez que pode diminuir a dependência de combustíveis fósseis como fonte de energia (ABDELAZIZ *et al.* 2014). Ainda, muitas microalgas eucarióticas têm a capacidade de armazenar quantidades significativas de compostos ricos em energia, tais como triacilglicerol (TAG) e amido, que podem ser utilizados para a produção de vários biocombustíveis distintos; Incluindo biodiesel e etanol (AHMAD *et al.* 2012).

De acordo com um estudo publicado em 2014 pela Utah State University (EUA), levando em consideração 15 anos de dados meteorológicos de mais de 4.300 lugares e uma série de simulações, O Brasil apresenta-se como um dos países com maior potencial de produção de óleos a partir de microalgas ao ar livre do mundo, sendo este rendimento variável de 16,45 a 24,68 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (Figura 5). A pesquisa pôde prever o volume de óleo de algas que poderia ser produzido por hectare de terra no período de um ano. Regiões mais quentes, naturalmente, são mais favoráveis ao cultivo de microalgas e, conseqüentemente, à produção de biocombustível. O Brasil é

um dos poucos países no mundo capazes substituir fontes de energia fósseis por fontes renováveis (BORGES, 2010).

Figura 5 - Mapa global do potencial de produção de lipídios a partir de microalgas

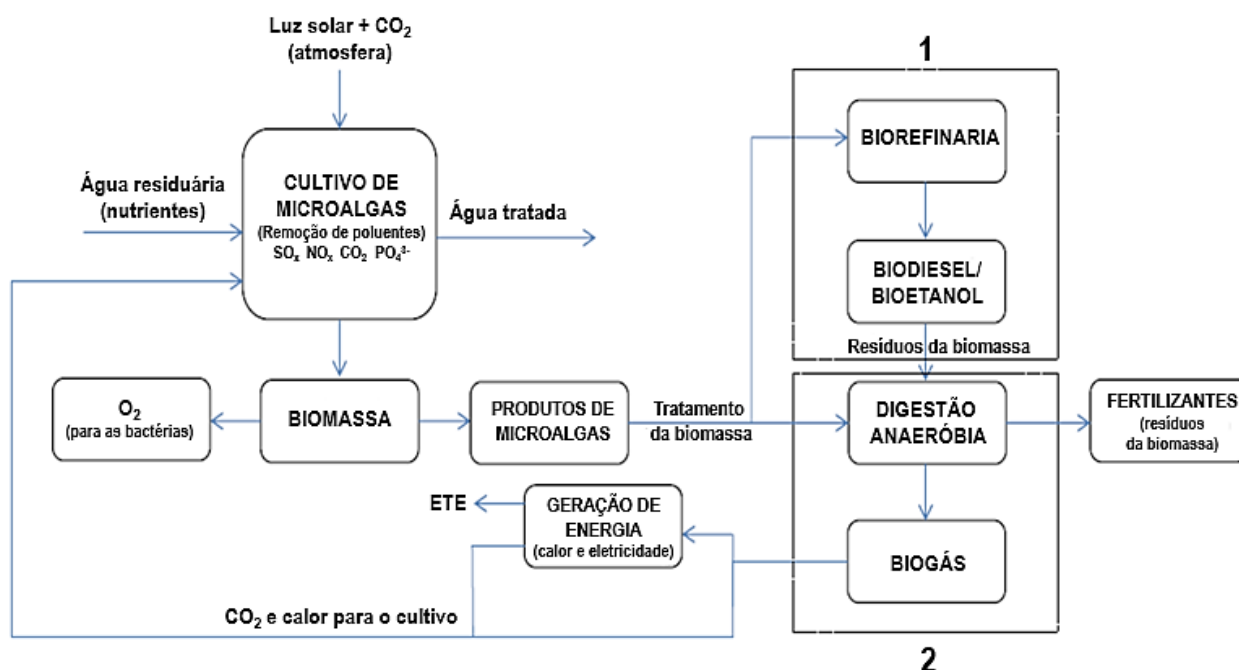


Fonte: MOODY *et al.* (2014).

O maior desafio para tornar o biocombustível produzido a partir de microalgas capaz de competir com a cadeia produtora de petróleo certamente é o custo. Estima-se que um barril de combustível à base de biomassa microalgal obtido com a tecnologia atual varia de US\$ 300-2600, enquanto que o barril de petróleo custa entre US\$ 40-80 (DISMUKES *et al.* 2008; ALABI *et al.* 2009).

A viabilidade energética e econômica do processo de produção de biocombustível a partir de microalgas poderá ser alcançada mediante adoção de modelos energeticamente favoráveis, tais como: produção de biodiesel dentro de uma unidade de produção multifuncional, fornecimento compatível de nutrientes durante o cultivo, aprimoramento das técnicas de extração de óleo, tratamento de efluentes, e aproveitamento da biomassa residual para produção de biogás, conforme Figura 6 (SIALVE *et al.* 2009; WIJFFELS e BARBOSA, 2010; HANNON *et al.* 2010; RAZON *et al.* 2011; LARSON *et al.* 2009 apud GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2012a; ALAM *et al.* 2012).

Figura 6 - Recuperação de nutrientes para um ciclo fechado de produção de energia a partir de biomassa microalgal



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

Os modelos atuais de produção de biocombustível líquido a partir de microalgas geram aproximadamente 60-70% de biomassa residual após a extração dos lipídios (WARD *et al.* 2014). A utilização da biomassa residual, agora composta predominantemente de proteínas e carboidratos, apresenta potencial para biometanização a partir da digestão anaeróbia, valendo-se de um recurso energeticamente positivo que poderá ser explorado para gerar energia elétrica e/ou térmica de calor (SHAH *et al.* 2018).

A digestão anaeróbia figura como a solução mais viável e promissora de destino da biomassa residual, pois permite a obtenção de uma fase líquida em que os nutrientes são remineralizados e, ao mesmo tempo, produz biogás como uma via de recuperação de energia (SIALVE *et al.* 2009; WARD *et al.* 2014; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2015; XIA *et al.* 2016).

3.2 Digestão anaeróbia de biomassa de microalgas e cianobactérias

O item 3.2 explora os estudos realizados no contexto da digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias, bem como apresenta os principais fatores limitantes ou pontos de inibição da performance de produção de metano durante o processo de biodegradação.

A digestão anaeróbia é definida como um processo natural que ocorre na ausência de oxigênio molecular, nitrato (NO_3^-) ou sulfato (SO_4^{2-}), no qual consórcios bacterianos interatuam estreitamente para viabilizar a fermentação estável e autorregulada de substrato orgânico complexo, do qual resultam, principalmente, os gases metano e dióxido de carbono (MOSEY, 1983; CHERNICHARO, 1997; ZHANG *et al.* 2016).

Embora a tecnologia de digestão anaeróbia já esteja bem estabelecida no que se refere à recuperação de energia através da degradação de resíduos, a maioria dos estudos publicados foram conduzidos no sentido de produzir biogás a partir de resíduos agropecuários, industriais e domésticos, mas aqueles com finalidade de fermentação da biomassa de microalgas, especificamente, ainda são escassos (PRAJAPATI *et al.* 2013).

Contudo, investigações sobre a digestão anaeróbia de microalgas com fins de produção de metano tem sido cada vez mais recorrentes (ZAMALLOA *et al.* 2011; DEBOWSKI *et al.* 2013; ZHAO *et al.* 2014; PASSOS *et al.* 2016,). Para se ter uma ideia, uma simples pesquisa realizada na base de dados do *Science Direct*™ em 06/08/2017 com título “*Anaerobic digestion of microalgae*” levou a mais de 1500 trabalhos sobre a produção de biogás por meio da fermentação de biomassa de microalgas nos últimos 5 anos.

Alguns trabalhos defendem que a tecnologia de digestão anaeróbia da biomassa residual de microalgas compensa os gastos energéticos dos meios de processamento e extração de lipídios da biomassa *in-natura*, atuando como alternativa à diminuição dos custos gerais oriundos do ciclo de produção de biocombustíveis da 3ª geração e promovendo a recuperação de nutrientes valiosos,

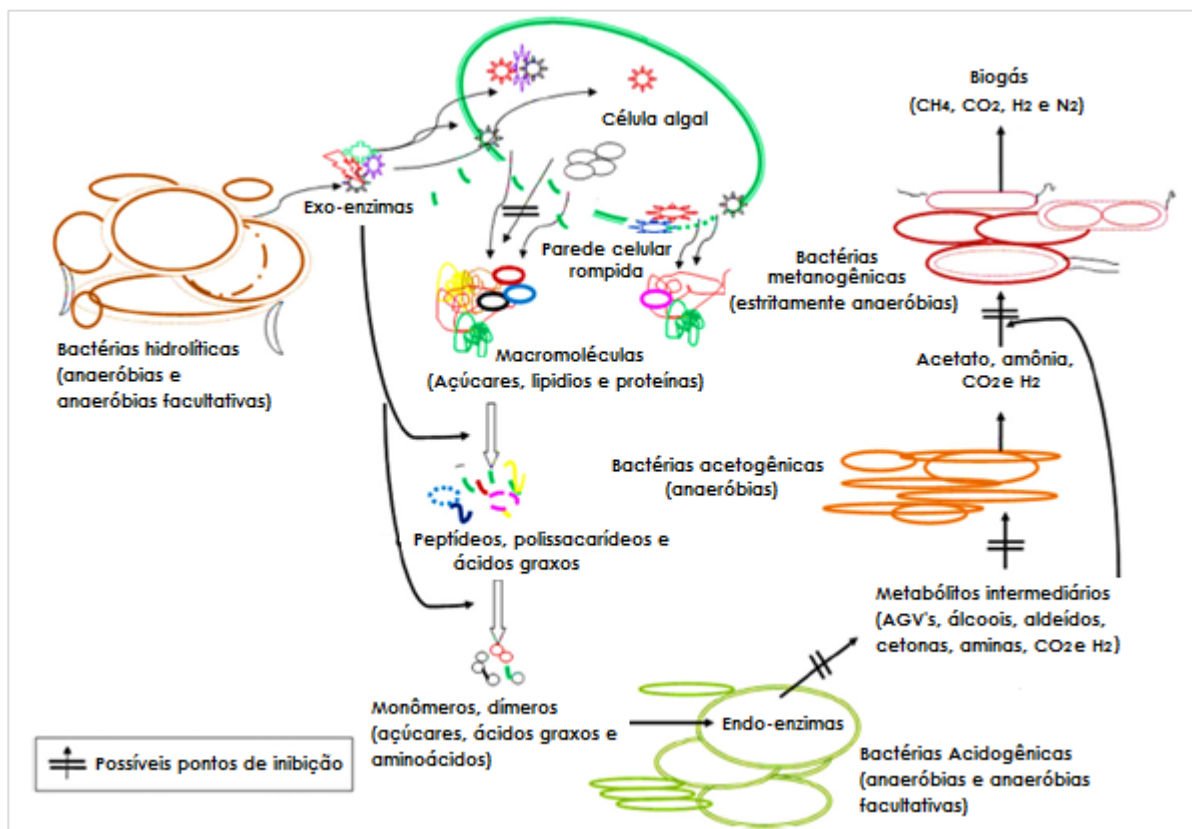
potencialmente recicláveis, como nitrogênio e fósforo (CHISTI, 2007; EHIMEN *et al.* 2011; WARD *et al.* 2014).

Outra justificativa para obtenção de energia a partir de microalgas, consiste na produção de metano a partir de microalgas inteiras. Nesse processo, ocorre a fermentação metanogênica de todas as macromoléculas que fazem parte da estrutura microalgal, isto é lipídios, proteínas e carboidratos, sem considerar a produção de biodiesel (DE SCHAMPHELAIRE e VERSTRAETE, 2009; SIALVE *et al.* 2009; DOUSKOVA *et al.* 2010; ZAMALLOA *et al.* 2011, MENDEZ *et al.* 2014).

Ambas condições de biomassa microalgal podem ser empregadas como substratos-base do processo de metanogênese, e o biometano produzido poderá ser queimado em unidades geradoras de energia e calor, injetado em redes de gás natural, ou ainda aproveitado como combustível de veículos automotores (CHEN e OSWALD, 1998; CHISTI, 2007).

A assimilação da biomassa de microalgas e cianobactérias é tipicamente protagonizada por diferentes associações bacterianas, tais como bactérias hidrolíticas, acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas. As bactérias hidrolíticas são responsáveis pela solubilização de polímeros orgânicos complexos, como proteínas, lipídios e carboidratos, em monômeros e dímeros (açúcares, ácidos graxos e aminoácidos) pela ação de exoenzimas que danificam a parede celular das algas. As bactérias acidogênicas metabolizam monômeros e dímeros convertendo-os em metabólitos intermediários, como ácidos graxos voláteis, álcoois, aldeídos e cetonas. Subsequentemente, através da atuação de endoenzimas, bactérias acetogênicas (grupo metabólico intermediário) convertem os produtos gerados na acidogênese em acetato, CO₂ e H₂, substrato assimilável pelas arqueas metanogênicas. Por fim, as bactérias metanogênicas convertem o material orgânico disponível em metano e gás carbônico, majoritariamente (PRAJAPATI *et al.* 2013).

Figura 7 - Representação esquemática da digestão anaeróbia de biomassa de algas com possíveis pontos de inibição



Fonte: Adaptado de PRAJAPATI *et al.* (2013).

As metanogênicas acetoclásticas produzem metano a partir da redução do ácido acético (cerca de 70%), enquanto que o metano produzido pelas metanogênicas hidrogenotróficas é obtido mediante a redução do hidrogênio e do gás carbônico (cerca de 30%). O grupo bacteriano que produz metano a partir do hidrogênio cresce mais rapidamente que aquele responsável pela assimilação do ácido acético, de modo que as metanogênicas acetotróficas usualmente limitam a velocidade de transformação do material orgânico complexo (MCCARTHY *et al.* 1964).

O êxito da etapa de hidrólise dos compostos poliméricos mais importantes na digestão anaeróbia (lipídios, proteínas e açúcares) está correlacionado ao desempenho de diferentes grupos de bactérias fermentativas na liberação de enzimas hidrolíticas extracelulares. Bactérias proteolíticas produzem proteases, as quais catalisam a hidrólise de proteínas em aminoácidos. Já bactérias celulolíticas e xilanolíticas sintetizam celulasas e/ou xilanasas que acabam por degradar celulose e xylan (carboidratos) a glucose e xilose, respectivamente. Bactérias lipolíticas produzem lipases, as quais são responsáveis por converter lipídios a glicerol e ácidos

graxos de cadeia longa. Na etapa seguinte, enzimas intracelulares, catalisadoras de reações que acontecem no interior da célula bacteriana, são potencialmente liberadas após a lise celular e exercem também funções extracelulares (BUX e CHISTI, 2016).

Os primeiros relatos sobre digestão de microalgas datam da década de 50 na Califórnia (EUA) e foram realizados por Golueke *et al.* (1957), que investigaram a viabilidade de conversão de energia química luminosa a metano através da fixação de luz solar por meio de microalgas, seguida por um processo de fermentação anaeróbia. Neste estudo, foram obtidos cerca de 170-320 ml de CH₄ por grama volátil de biomassa de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., cultivadas como parte de um sistema de tratamento de efluentes.

Estudos posteriores, realizados por Golueke e Oswald, descreveram a função das microalgas no tratamento de efluentes utilizando sistemas integrados avançados de lagoas e seu potencial de biometanização em plantas de energia solar. O sistema proposto era completamente fechado e constituído de 3 unidades elementares: cultivo de biomassa de microalgas, unidade de crescimento bacteriano aeróbio e digestor anaeróbio. Os resultados obtidos indicaram que era possível converter energia luminosa em energia química em curto espaço de tempo, juntamente com a recuperação do líquido e a manutenção da atmosfera gasosa a longo prazo (GOLUEKE e OSWALD, 1960; 1967; 1994).

Atualmente, a utilização de microalgas para produção de metano está, em maior parte, associada à tecnologia de fitorremediação, isto é, microalgas empregadas na absorção de nutrientes, e então coletadas, compondo unidades de tratamento de efluentes. A validação positiva do modelo de integração entre a digestão anaeróbia de biomassa de microalgas e o tratamento de águas residuárias tem sido relatada por alguns estudos (RAWAT *et al.* 2011; CAI *et al.* 2013a, 2013b; DALRYMPLE *et al.* 2013, CABANELAS *et al.* 2013; WANG *et al.* 2013; PASSOS *et al.* 2014a).

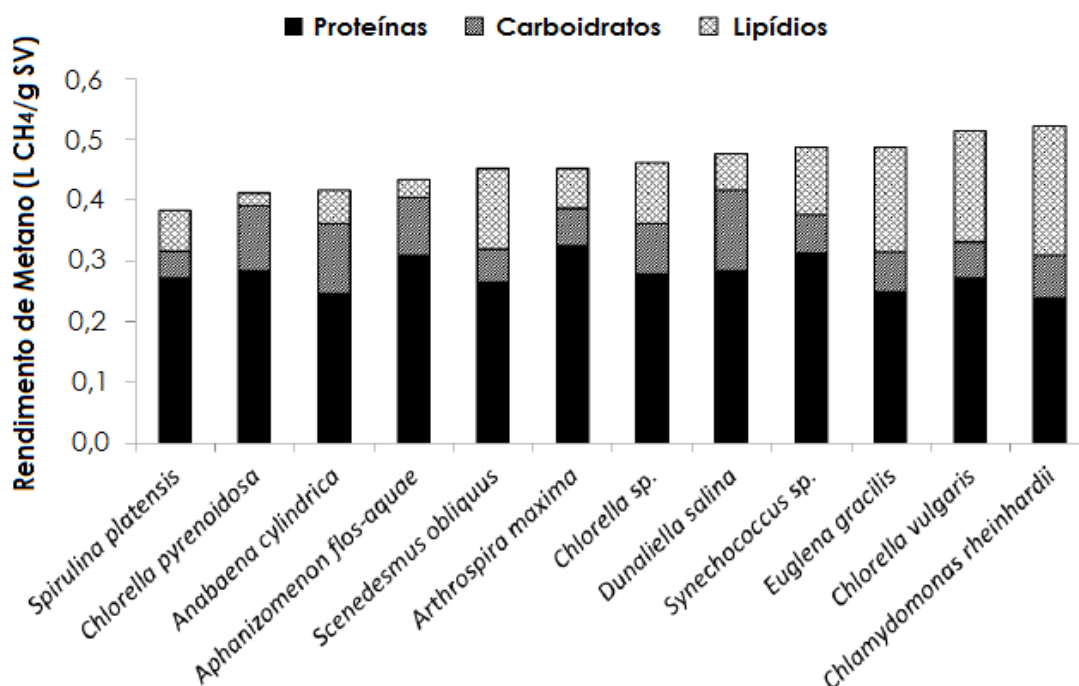
O rendimento de metano no processo de digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias é diretamente proporcional à espécie selecionada e sua composição

bioquímica. Quando a composição da matéria orgânica é conhecida, é possível expressar o potencial teórico de metano a partir da fórmula adaptada por Symons e Buswell (1933), a qual é amplamente utilizada por Sialve *et al.* (2009) e Singh e Olsen (2011).

Rendimentos de 0,851, 1,014 e 0,415 L CH₄ g SV⁻¹ para proteínas, lipídios e carboidratos, respectivamente, foram relatados por Angelidaki e Sanders (2004) e foram utilizados como estimativas de potencial estequiométrico de metano (PEM) para diversas biomassas de microalgas estudadas por Sialve *et al.* (2009). Teoricamente, o teor lipídios tem a maior influência sobre o rendimento de metano, no entanto, como os lipídios geralmente não são a principal fonte de produção de metano em estudos realizados, a correlação entre o teor de lipídios e o rendimento real de metano ainda é bastante desconhecida.

Embora esta abordagem teórica proporcione uma boa estimativa aproximada do rendimento de metano da biomassa de algas, ela pode majorar os resultados de potencial de produção de metano a longo prazo, uma vez que considera que 100% da matéria orgânica disponível será assimilada pelo consórcio bacteriano anaeróbio durante o processo de digestão, bem como não considera a atuação de interferentes de outras fontes. A estimativa do PEM de diferentes biomassas de algas, incluindo *Chroococcus* sp., *Spirulina* sp. foi realizada anteriormente (PRAJAPATI *et al.* 2013).

Figura 8 - Rendimento teórico de metano a partir de proteínas, carboidratos e lipídios presentes em várias espécies de algas calculadas de acordo com Angelidaki e Sanders (2004)



Fonte: Adaptado de Torres *et al.* (2014).

Os dados sobre proteínas, carboidratos e lipídios foram extraídos de Becker (2007), Sialve (2009), Griffiths e Harrison (2012) e González-Fernández *et al.* (2012).

Conforme defendido por González-Fernández (2012c), os resultados mostrados na Figura 8 indicam que a relação entre as macromoléculas da célula não é o parâmetro mais importante e determinante do rendimento real de metano baseado em algas. A composição do substrato orgânico inerte, como a parede celular, por exemplo, exerceria uma função muito mais crucial (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012c).

Alguns outros fatores, além da composição bioquímica da célula, têm demonstrado uma interferência mais significativa no potencial de produção de metano a partir da biomassa de microalgas e cianobactérias, tais como: concentração de substrato, tempo de retenção, temperatura, pH, presença de inibidores da metanogênese e, principalmente, a biodegradabilidade da parede celular (YADVIKA *et al.* 2004; HARUN *et al.*; 2010; MUSSGUG *et al.* 2010; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2012c; JONES e MAYFIELD, 2012; SAHARAN *et al.* 2013, WARD *et al.* 2014). Esses

princípios de inibição metanogênica serão discutidos em maior profundidade a partir da próxima seção.

3.2.1 Carga orgânica e tempo de retenção

Baixas concentrações de sólidos voláteis (SV) de microalgas podem reduzir o desempenho de digestores anaeróbios e levá-los ao fracasso (GOLUEKE *et al.* 1957). De Schamphelaire e Verstraete (2009) chegaram à conclusão de que uma etapa prévia de concentração de microalgas seria necessária para um desempenho superior dos digestores anaeróbios. Durante fase experimental, os autores observaram que a solução de biomassa de microalgas, de baixa carga orgânica, era muito diluída, e acabou provocando a lavagem (*washout*) da comunidade bacteriana anaeróbia quando associada ao baixo tempo de retenção hidráulica (TDH) dentro do digestor.

O problema de *washout* bacteriana e a baixa carga de substrato digerível pode ser superado a partir da concepção de um design mais acertado de digestor anaeróbio. Manipulando um biorreator em escala laboratorial para digerir anaerobiamente *Phaeodactylum tricornutum*, Zamalloa *et al.* (2012) relataram um tempo de TDH de 2,5 dias e um aumento de 10-20 dias do tempo de retenção de sólidos (TRS), mediante a implantação de membranas. Rendimentos superiores de metano também foram alcançados por Inglesby e Fisher (2012) na digestão anaeróbia da biomassa de *Arthrospira maxima* em um reator de leiteo fluidizado com uma célula integrada de recirculação microbiana.

Taxas de carregamento orgânico (TCO) altas potencializam o rendimento de metano, ao passo que prolongam o tempo de retenção dos sólidos. Em escala laboratorial, para digestão anaeróbia de microalgas, o TDH deve variar entre 15 e 30 dias (BOROWITZKA 1992; EHIMEN *et al.* 2010; RAS *et al.* 2011). No estudo da viabilidade de um sistema acoplado de produção e digestão anaeróbia de *Chlorella vulgaris* com TDH de 16 e 28 dias, com uma carga orgânica correspondente à 1 gDQO/L, Ras *et al.* (2011) conseguiram um aumento da remoção de DQO em 51% com produção de CH₄ da ordem de 240 ml gSV⁻¹, a partir do aumento do TDH para 28 dias.

3.2.2 Relação Substrato/Inóculo

A relação substrato/inóculo (S/I) não exerce apenas influência sobre a cinética do processo de digestão anaeróbia, acelerando ou retardando a taxa de degradação do substrato, mas também influenciando no rendimento de CH₄ (RAPOSO *et al.* 2011). Estudos conduzidos por Zeng *et al.* (2010), na avaliação da melhor proporção S/I, concluíram que a razão de 1 g SV para 1 g SV foi a que proporcionou o máximo rendimento de CH₄ na digestão de *Microcystis* sp. O mesmo valor de 1 g SV/g SV foi confirmado por Zhao e colaboradores (2014), que alcançaram a máxima produção de CH₄ na fermentação de biomassa de microalgas pós extração de lipídios utilizando essa proporção. Por outro lado, Cho *et al.* (2005) sugerem que as relações S/I estejam situadas no intervalo 0,4 - 0,6 g DQO/g SV, uma vez que estimulam a degradação do substrato e reduzem o tempo necessário para digestão completa por parte do consórcio bacteriano. Alzate *et al.* (2012), avaliaram os efeitos de 3 relações S/I (0,5, 1 e 3 g DQO/g SV) na digestão de uma biomassa mista de microalgas, e concluíram que o melhor desempenho, em termos de rendimento de biogás e biodegradabilidade, foi obtido a partir da relação S/I de 0,5 g DQO/g SV. Diversos estudos acerca da digestão anaeróbia de microalgas empregam uma relação S/I de 0,5 g DQO/g SV (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2012b; PASSOS *et al.* 2013).

3.2.3 Temperatura e pH

As melhores faixas de temperatura para digestores anaeróbios são mesofílicas (30-38°C) e termofílicas (50-55°C) (CHERNICHARO, 1997). Além disso, González-Fernández *et al.* (2012b) argumentam que o rendimento de metano na degradação de biomassa microalgal pode ser potencializado com o aumento dessas temperaturas, em decorrência da redução da atividade fotossintética das microalgas. O aumento da temperatura entre 15°C e 25°C favorece à estabilidade dos reatores anaeróbios na decomposição de microalgas em decorrência do aumento da taxa de consumo de ácidos graxos voláteis pelas bactérias metanogênicas (FOREE e MCCARTY, 1970). Apesar de Chen *et al.* (2008) defenderem que o incremento na temperatura interfere na cinética de crescimento bacteriano e na produção de amônia, o aumento da temperatura, em termos gerais, viabiliza a metanogênese por influenciar nas taxas de reações enzimáticas e de difusão do substrato.

No que se refere ao pH, Angelidaki (2002) defende que a faixa ótima para metanogênese deve situar-se no intervalo 6,5-8,5. Da mesma forma, Chernicharo (1997) alerta que valores abaixo de 6,0 e superiores a 8,3 são extremamente desfavoráveis às bactérias metanogênicas, podendo interromper a produção de metano e, portanto, devem ser evitados. Visando atender tais condições, valores de pH foram ajustados em diversos estudos de digestão anaeróbia de microalgas para uma faixa entre 7 e 8 (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2012a; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2012b; MENDEZ *et al.* 2013; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2014).

3.2.4 Relação C/N

Relações C/N inferiores a 20 provocam um desequilíbrio entre os requisitos de carbono e nitrogênio pelo consórcio bacteriano anaeróbio na digestão de microalgas, sendo uma das principais dificuldades relatadas por diversos autores (YEN e BRUNE, 2007; VERGARA-FERNANDEZ *et al.* 2008; SIALVE *et al.* 2009). Sialve *et al.* (2009) relatam que, em baixo pH, este desequilíbrio promove a liberação de amônia livre, a qual é, em altas concentrações, inibitória à atividade das metanogênicas, levando ao acúmulo de ácidos orgânicos no reator e a interrupção parcial ou completa da produção de biogás.

Uma alternativa para o aumento da relação C/N é a co-digestão da biomassa de microalgas com outros resíduos ricos em carbono, tais como dejetos de suínos (SHOUQUAN *et al.* 2009; GONZALEZ-FERNANDEZ *et al.* 2011b) e bovinos (RAMAMOORTHY *et al.* 1989), espigas de milho (SHUCHUAN *et al.* 2012), lodo de esgoto (SAMSON e LEDUY, 1983), sólidos de águas residuárias (YAUN *et al.* 2012), resíduos de papel (YEN e BRUNE, 2007), glicerol (EHIMEN *et al.* 2009), entre outros.

O aumento da relação C/N de 6,7 para 18 realizado por Yen e Brune (2007), por meio da adição de resíduos de papel à biomassa de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp., levou ao aumento de quase 100% no rendimento de biogás, cerca de 1170 ml, quando realizados em uma proporção 0,5/0,5 via co-digestão anaeróbia. Resultados positivos acerca da produção de biogás também foram evidenciados por Samson e Leduy (1983) em um experimento de co-digestão de *Spirulina máxima* combinada a

lodo de esgoto, onde o rendimento final de gás foi superior em 2 vezes aqueles digestores inoculados apenas com substrato de biomassa microalgal. Já na co-digestão de *Nannochloropsis salina* com resíduos lipídicos, Park e Li (2012) conseguiram aumentar o carregamento orgânico através do incremento da relação C/N e evidenciaram um rendimento superior de CH₄. Estudos concordam que a ótima relação C/N para digestão anaeróbia de microalgas deve situar-se entre 20 e 30 (PARKIN e OWEN, 1986; YEN e BRUNE, 2007).

3.2.5 Nitrogênio amoniacal

A degradação biológica de matéria orgânica nitrogenada, especialmente sob a forma de proteínas e ureia, resulta na produção de nitrogênio na forma amoniacal (N-NH₄⁺) (CHEN *et al.* 2008). Altas concentrações dessa forma de nitrogênio não apenas têm efeito prejudicial sobre as bactérias metanogênicas através da inibição direta da enzima sintetizadora de CH₄, mas também provocam o desequilíbrio de prótons e deficiência de potássio mediante a difusão passiva da molécula hidrofóbica de íon amônio incorporada à célula microbiana (KAYHANIAN, 1999; SIALVE *et al.* 2009). Em termos de taxas de crescimento e influência na produção de metano, as acidogênicas são mais sensíveis a altos teores de N-NH₄⁺, enquanto que as metanogênicas são mais resistentes (ZEEMAN *et al.* 1985; WIEGANT e ZEEMAN, 1986; ANGELIDAKI e AHRING, 1993; CHEN *et al.* 2008). Parkin e Owen (1986) argumentam que acima de 3000 mg N-NH₄⁺/L os efeitos inibitórios sobre o consórcio anaeróbio são extremamente potencializados, enquanto que para concentrações que variam entre 1500 e 3000 mg N-NH₄⁺/L as implicações causadas possuem caráter moderado. À vista disso, tais teores devem ser evitados em digestores anaeróbios.

3.2.6 Salinidade

Níveis elevados de salinidade foram demonstrados ser inibitórios à digestão anaeróbia, uma vez que podem causar desidratação das células bacterianas devido ao aumento da pressão osmótica (CHEN *et al.* 2008). Os íons de metais leves como, sódio, magnésio, cálcio e alumínio são tóxicos em níveis elevados (MCCARTY, 1964; CHEN *et al.* 2008). Da mesma forma, sais alcalinos terrosos podem ser extremamente tóxicos às bactérias metanogênicas quando em altas concentrações, porém, em

concentrações reduzidas, são necessários ao metabolismo celular bacteriano (MCCARTY, 1964). Ainda assim, Vergara-Fernandez *et al.* (2008) e Buxy *et al.* (2013) demonstraram que a digestão anaeróbia de microalgas marinhas é possível. Estes últimos relataram um rendimento de 204 ml CH₄/g SV na digestão de *Nannochloropsis oculata* marinha, cultivada em condições de salinidade da água do mar. Enquanto que Vergara-Fernandez *et al.* (2008) registraram uma produção acumulada de biogás da ordem 260 ml/g ST de uma mistura 1:1 de *Macrocystis pyrifera* e *Durvillea antarctica*. Ademais, Rinzema *et al.* (1988) concluíram que concentrações de Na⁺ iguais a 5, 10 e 14 g/L causaram 10%, 50% e 100% de inibição com relação à atividade metanogênica acetoclástica específica máxima de lodo granular em reatores UASB.

3.2.7 Outros fatores de influência na digestão anaeróbia

Além dos fatores citados acima, alguns estudos relatam que tanto macronutrientes, como N e P, quanto oligoelementos tem efeitos significativos sobre a atividade microbiana na produção de biogás durante a digestão anaeróbia (FLORENCIO, 1993; CHEN e CHENG *et al.* 2008; DEMIREL e SCHERER, 2011; ZHANG *et al.* 2011). No entanto, alguns autores argumentam que a composição bioquímica das microalgas por si só já atende às exigências da microflora anaeróbia durante o processo de degradação desse substrato, não sendo necessária, portanto, adição extra de nutrientes ao sistema (GROBBELAAR, 2004; SIALVE, 2009).

Outros fatores que também interferem na digestão anaeróbia são os ácidos graxos voláteis (AGV) e alcalinidade. O acúmulo de AGV pode levar à inibição tanto de bactérias acetogênicas quanto de metanogênicas dentro dos reatores anaeróbios, e ocorre em função das sobrecargas, sejam elas orgânicas, hidráulicas ou tóxicas, ou ainda sob variações bruscas de temperatura ou queda do pH. Concentrações de até 8000 mg/L não são tóxicas à digestão anaeróbia, desde que o pH esteja próximo de 7. Já a alcalinidade, em concentrações adequadas, proporciona efeito tampão ao meio, impedindo indiretamente o acúmulo de ácidos orgânicos e possibilitando o equilíbrio do sistema mediante a neutralização dos AGV produzidos durante as fases de hidrólise e acidogênese (DE SOUZA, 1984; CHERNICHARO, 1997).

O Sulfato (SO_4^{2-}) também tem potencial de interferência no processo de digestão. Quando o substrato orgânico da digestão apresenta altas concentrações deste sal, bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem utilizá-lo como aceptor de elétrons e convertê-lo em sulfeto, sendo este extremamente tóxico às metanogênicas em concentrações superiores a 200 mg/L. Visto que as BRS têm maior afinidade por acetato que as metanogênicas, uma forte competição acontece sob baixas concentrações de carbono e de ácido acético, em relações DQO/ SO_4^{2-} situadas na faixa 1,7-2,7. O aumento dessa proporção é favorável às metanogênicas, enquanto que a redução favorece as bactérias redutoras de sulfato (BITTON, 1994; PARKIN e OWEN, 1986).

3.3 Biodegradabilidade da parede celular e pré-tratamentos

O item 3.3 discorre sobre os principais tipos de pré-tratamentos utilizados como mecanismos de lise celular, os quais visam aumentar a disponibilidade de conteúdo intra-celular das microalgas e cianobactérias no meio aquoso e favorecer o processo de digestão anaeróbia, potencializando, eventualmente, o volume de metano produzido.

Embora o potencial de produção de CH_4 seja dependente da composição bioquímica das microalgas, a resistência da parede celular é considerada o fator limitante mais significativo ao seu processo de digestão (SIALVE *et al.* 2009). Células de microalgas apresentam parede celular rígida constituída, principalmente, de celulose, hemicelulose e biopolímeros, moléculas extremamente resistentes ao ataque enzimático bacteriano (MUSSGNUNG *et al.* 2010; RAS *et al.* 2010). Portanto, a cinética da digestão anaeróbia é altamente dependente da composição bioquímica e da biodegradabilidade da parede celular da espécie de microalgas (SIALVE *et al.* 2009).

Mussgnung *et al.* (2010) avaliaram o rendimento de CH_4 a partir de seis espécies diferentes de microalgas, obtendo valores da ordem de 287 a 587 ml CH_4 /g SV. Os menores volumes de metano foram alcançados a partir de espécies com baixa degradação celular e alta quantidade de biopolímeros indigeríveis, como esporopolenina, enquanto que as espécies microalgais que não eram constituídas de

qualquer parede celular ou à base de proteínas apresentaram produção superior de CH_4 . Isto significa que células intactas de microalgas não foram capazes de disponibilizar material intracelular ao consórcio bacteriano, limitando a etapa de hidrólise, e, conseqüentemente, o processo completo de biometanização. Nesse sentido, estudos concordam que a digestibilidade da célula microalgal, bem como o rendimento de CH_4 , podem ser potencializados por meio físico, químico ou biológico, através de mecanismos de pré-tratamento (SIALVE *et al.* 2009; MUSSGNUNG *et al.* 2010; ZAMALLOA *et al.* 2012; GONZÁLEZ-FERNANDEZ *et al.* 2012, PASSOS *et al.*; 2013, MAHDY *et al.* 2015; GRUBER-BRUNHUMER *et al.* 2016; SOLÉ-BUNDÓ *et al.* 2017).

Embora uma etapa prévia de tratamento torne o processo mais complexo e oneroso, ela pode tornar o procedimento de digestão mais eficaz e reduzir o custo total para que seja possível obter um balanço energético positivo em comparação com a biomassa não pré-tratada (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). A Tabela 5 apresenta um resumo de estudos que empregaram diferentes tipos de pré-tratamentos à biomassa de microalgas e cianobactérias tendo em vista o aumento da solubilização do material orgânico e potencialização do rendimento de CH_4 .

Tabela 5 – Pré-tratamentos aplicados à biomassa de microalgas e cianobactérias e respectivos rendimentos de CH₄

Espécies de Microalga/ cianobactéria	Condições da digestão e tipo de reator	Pré-tratamento		Rendimento de CH ₄		Autor / Ano
		Tipo	Condições	Antes do pré- tratamento	Depois do pré- tratamento	
<i>Scenedesmus</i> sp.	33 dias (35°C; batelada)	Térmico	70°C, 15 min em banho maria 90°C, 15 min em banho maria	76 ml CH ₄ /g DQO	85 ml CH ₄ /g DQO 170 ml CH ₄ /g DQO	GONZÁLEZ- FERNÁNDEZ <i>et al.</i> 2012
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella kessleri</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>	32 dias (38°C, batelada)	Secagem	105°C (24 h)	387 ml CH ₄ /g SV 218 ml CH ₄ /g SV 178 ml CH ₄ /g SV	306 ml CH ₄ /g SV 168 ml CH ₄ /g SV 35,3 ml CH ₄ /g SV	MUSSGNUM <i>et al.</i> 2010
Biomassa de microalgas: <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Monoraphidium</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., <i>Amphora</i> sp.,	15 dias TDH (37°C, contínuo)	Térmico	95°C, t= 10 h	100 ml CH ₄ /g SV	120 ml CH ₄ /g SV	PASSOS <i>et al.</i> 2014
	20 dias TDH (37°C, contínuo)		95°C, t= 10 h	180 ml CH ₄ /g SV	310 ml CH ₄ /g SV	
	20 dias TDH (37°C, contínuo)		75°C, t= 10 h		300 ml CH ₄ /g SV	
<i>Spirulina maxima</i>	60 dias (35°C, contínuo)	Ultrassom	10 min (Gerador Polytron)		170 ml CH ₄ /g SV	SAMSON <i>et al.</i> 1983
		Termoquímico	50°C (1h em banho d'água)	190 ml CH ₄ /g SV	210 ml CH ₄ /g SV	
			100°C (1h em banho d'água) 150°C (1h em esterilizador a vapor)		220 ml CH ₄ /g SV 240 ml CH ₄ /g SV	

<i>Scenedesmus</i> sp.	34 dias (35°C, batelada)	Térmico	70°C, 25 min 80°C, 25 min	82 ml CH ₄ /g DQO	89 ml CH ₄ /g DQO 129 ml CH ₄ /g DQO	GONZÁLEZ- FERNÁNDEZ <i>et al.</i> 2012
		Ultrassom	130 MJ/kg, 30 min		154 ml CH ₄ /g DQO	
<i>Chlorella vulgaris</i>	29 dias (35°C, batelada)	Aquecimento de alta pressão	140°C, (10 e 20 min 3 bar) 160°C, (10 e 20 min, 6 bar) 180°C, (10 e 20 min, 10 bar)	156 ml CH ₄ /g DQO (91 ml CH ₄ /g SV)	131 ml CH ₄ /g SV 151 ml CH ₄ /g SV 135 ml CH ₄ /g SV	MENDEZ <i>et al.</i> 2014
<i>H. reticulatum</i> (alga filamentosa)	45 dias (35°C, batelada)	Redução de tamanho (homogeneização via ultrassom)	50-5000 J/ml	170 ml CH ₄ /g SV	310-350 ml CH ₄ /g SV	LEE <i>et al.</i> 2013
		Ultrassom				
Rhizoclonium (alga filamentosa)	28 dias (53°C, batelada)	Redução de tamanho (corte)	5 cm, 1 cm		93-100 ml CH ₄ /g ST	EHIMEN <i>et al.</i> 2013
			<0.1 mm			
		Redução de tamanho (mistura)	20 kHz, 10 min	230-240 ml CH ₄ /g ST digerido	100-113 ml CH ₄ /g ST 113-127 ml CH ₄ /g ST	
		Sonicação				
		Enzimas	Combinação de: lipase, xilanase, α-amilase, protease, celulase.		143 ml CH ₄ /g ST	
Biomassa de algas: <i>Pediastrum</i> sp., <i>Micractinium</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp.	91 (130) dias TRS (20°C, batelada, AVR)	Térmico (congelamento)	-20°C, 24 h, e fusão em temperatura ambiente (20°C)	103 ml CH ₄ /g SV	155 ml CH ₄ /g SV	KINNUNEN <i>et al.</i> 2014
	contínuo (37°C, TDH: 14 – 16 dias)		57°C, 3.8 h -20°C, 24 h, e fusão em temperatura ambiente (20°C)	179 ml CH ₄ /g SV	136 ml CH ₄ /g SV 205 ml CH ₄ /g SV	
Biomassa de algas	TDH 15 dias (35°C, batelada)	Micro-ondas	900 W, t=3 min:			PASSOS <i>et al.</i> 2014
	20 dias (35°C, batelada)		110 kJ/kg SV 200 kJ/kg SV	130 ml CH ₄ /g SV 170 ml CH ₄ /g SV	170 ml CH ₄ /g SV 270 ml CH ₄ /g SV	

Biomassa de algas	28 dias (38°C, batelada)	Térmico	100°C por 8 h	340 ml CH ₄ /g SV	450 ml CH ₄ /g SV	CHEN <i>et al.</i> 1998
<i>Chlorella vulgaris</i>	25 dias (35°C, batelada)	Ultrassom	200 J/ml	230 ml CH ₄ /g SV	440 ml CH ₄ /g SV	PARK <i>et al.</i> 2013
Biomassa de algas: <i>Scenedesmus obliquus</i>, <i>Chlorella vulgares</i>	46 dias (35°C, batelada)	Micro-ondas	21 800 kJ/kg ST 43 600 kJ/kg ST 65 400 kJ/kg ST	117 ml CH ₄ /g SV	140 ml CH ₄ /g SV 160 ml CH ₄ /g SV 210 ml CH ₄ /g SV	PASSOS <i>et al.</i> 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	23 dias (35°C, batelada)	Térmico com enzimas	75°C, 30 min (T)	191 ml CH ₄ /g DQO	191 ml CH ₄ /g DQO	MAHDY <i>et al.</i> 2014
			Carbohidralase pH 5.5, (50°C, t=5 h), 75°C t=15 min		217 ml CH ₄ /g DQO	
			Protease pH=8, (50°C, t=5 h), 75°C t=15 min		287 ml CH ₄ /g DQO	
			75°C, t=30 min; Protease pH=8, (50°C, t=5 h), 75°C t=15 min (T+A)		271 ml CH ₄ /g DQO	
			Carbohidralase pH=5.5, (50°C, t=3 h) e Protease (50°C, t=2 h), 75°C t=15 min (V+A)		287 ml CH ₄ /g DQO	
			75°C, t=30 min; Carbohidralase pH=5.5, (50°C, t=3 h) e Protease (50°C, t=2 h), 75°C t=15 min		300 ml CH ₄ /g DQO	

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	23 dias (35°C, batelada)	Térmico com enzimas	Carbohidralase pH=5.5, (50°C, t=5 h), 75°C t=15 min (V)	263 ml CH ₄ /g DQO	256 ml CH ₄ /g DQO	MAHDY <i>et al.</i> 2014
			75°C, t=30 min; Carbohidralase pH=5.5, (50°C, t=5 h), 75°C t=15 min		279 ml CH ₄ /g DQO	
			Protease pH=8, (50°C, t=5 h), 75°C t=15 min (A)		289 ml CH ₄ /g DQO	
			Carbohidralase pH=5.5, (50°C, t=3 h) e Protease (50°C, t=2 h), 75°C t=15 min (V+A)		312 ml CH ₄ /g DQO	
			75°C, t=30 min; Carbohidralase pH=5.5, (50°C, t=3 h) e Protease, (50°C, t=2 h), 75°C t=15 min		~340 ml CH ₄ /g DQO	
<i>Chlorella vulgaris</i>	30 dias (35°C, batelada)	Termoquímico	120°C, t=20 min	139 ml CH ₄ /g DQO	180 ml CH ₄ /g DQO	MENDEZ <i>et al.</i> 2013
			120°C, t=40 min		268 ml CH ₄ /g DQO	
			120°C, t=40 min + 4 M H ₂ SO ₄ em pH = 2		229 ml CH ₄ /g DQO	
			120°C, t=40 min + 4 M NaOH em pH = 10		241 ml CH ₄ /g DQO	
			4 M H ₂ SO ₄ em pH = 2		113 ml CH ₄ /g DQO	
			4 M NaOH em pH = 10		120 ml CH ₄ /g DQO	
<i>Isochrysis galbana</i>	15 dias (30°C, batelada)	Mecânico Químico Térmico Térmico	mistura t=1 min 40°C, 0.2% v/v ácido, t=16 h 60°C, t=16 h 40°C, t=16 h	17 ml CH ₄ /g SV	10,0 ml CH ₄ 16,4 ml CH ₄ 2,87 ml CH ₄ 2,29 ml CH ₄	SANTOS <i>et al.</i> 2014

Sólidos de alga fresca de lagoa de estabilização	7 meses (20°C, semi-contínuo)	Ultrassom	600 W, 90 min	230 ml CH ₄ /g SV	210 ml CH ₄ /g SV	SUKIAS <i>et al.</i> 2007.
		Ultrassom	600 W, 90 min	14 m ³ CH ₄ /kg SV	16 ml CH ₄ /g SV	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	12 dias (37°C, batelada)	Térmico	90°C, 4 h 90°C, 4 h	240 ml CH ₄ /g SV	290 ml CH ₄ /g SV 330 ml CH ₄ /g SV	MARSOLEK, <i>et al.</i> 2013
<i>Scenedesmus</i>	35 dias (38°C, batelada)	Extração de lipídios Hidrólise térmica de alta pressão Extração de lipídios e HTAP	Solvente hexano, aparato Soxhlet t=6 h (A)		330 ml CH ₄ /g SV	KEYMER <i>et al.</i> 2013
			170°C, 800 kpa, t=30 min (B) A + B	180 ml CH ₄ /g SV	240 ml CH ₄ /g SV 380 ml CH ₄ /g SV	
Biomassas de algas: A: <i>Chlamydomonas</i>, <i>Scenedesmus</i>, <i>Nannochloropsis</i>. B: <i>Acutodesmus obliquus</i>, <i>Oocystis</i> sp., <i>Phormidium</i>, <i>Nitzschia</i> sp. C: <i>Microspora</i>	60 dias (35°C, batelada)	Ultrassom	10,000 kJ/kg ST 27,000 kJ/kg ST 40,000 kJ/kg ST 57,000 kJ/kg ST	A=272 ml CH ₄ /g SV	A=310 ml CH ₄ /g SV (U1) B=223 ml CH ₄ /g SV (U3,U4) C=314 ml CH ₄ /g SV (U1)	ALZATE <i>et al.</i> 2012
		Hidrólise térmica	110°C, 1 bar 140°C, 1.2 bar 170°C, 6.4 bar t=15 min	B=198 ml CH ₄ /g SV	A=398 ml CH ₄ /g SV (T3) B=307 ml CH ₄ /g SV (T3)	
		Microaerobiológico	55°C 12 h 14 h no escuro	C=255 ml CH ₄ /g SV	C=413 ml CH ₄ /g SV (T1) 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</i> sp.	32-40 dias (37°C, batelada)	Mecânico, térmico e químico	Extração de aminoácidos Extração de lipídios	140 ml CH ₄ /g SV	273 ml CH ₄ /g SV 212 ml CH ₄ /g SV	RAMOS-SUAREZ, <i>et al.</i> 2014

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

3.3.1 Pré-tratamento térmico

A solubilização de frações orgânicas particuladas e moléculas orgânicas poliméricas de microalgas é potencializada a partir da aplicação de calor, devido à quebra das pontes de hidrogênio que constituem complexos cristalinos de celulose e lignocelulose. Além disso, o calor reduz a viscosidade da biomassa, facilitando o processo de digestão pelos micro-organismos (CARRERE *et al.* 2010). As principais vantagens do pré-tratamento térmico incluem a alta eficiência de solubilização e o amplo potencial para ser empregado em larga escala, enquanto que as maiores desvantagens estão relacionadas ao alto consumo energético, em alguns casos, e o risco de formação de compostos tóxicos. Tanto a temperatura quanto o tempo de exposição podem influenciar na eficiência do pré-tratamento térmico, embora a temperatura figure como o elemento crucial de desintegração da biomassa (PASSOS *et al.* 2014c).

A partir da implementação de uma etapa de pré-tratamento térmico em um reator revestido (*Jackted reactor*) a 90°C por 120 min, González-Fernández *et al.* (2012b) alcançaram 48% de biodegradabilidade da biomassa de *Scenedesmus* sp., rendendo 133 dm³ CH₄/kg DQO. Enquanto que a biodegradabilidade da mesma biomassa pré-tratada a 70°C, também por 120 min, foi de 22-24%, mesmo potencial de biodegradabilidade alcançado pela biomassa não pré-tratada. Foram observadas células intactas de *Scenedesmus* sp. após o pré-tratamento a 70°C, por isso o aumento do rendimento final de CH₄, com relação à biomassa *in natura*, foi insignificante. Resultados positivos também foram relatados por Chen e Oswald (1998) que investigaram o pré-tratamento térmico combinado a um pré-tratamento químico utilizando NaOH. Um aumento em 33% da produtividade de biogás foi evidenciado na fermentação da biomassa de microalgas aquecida a 100°C por 8 h com concentração de 3,7% de sólidos e sem adição do NaOH, com relação à biomassa que não foi submetida a nenhum mecanismo de pré-hidrólise.

Na avaliação do rendimento de CH₄ de duas misturas de microalgas submetidas à hidrólise térmica através da injeção direta de vapor a 9 bar e temperaturas de 110°C, 140°C e 170°C, seguido por rápida descompressão, em um processo chamado de “Explosão de vapor”, Alzate *et al.* (2012) alcançaram as

melhores produtividades (398 ml CH₄/g SV e 307 ml CH₄/g SV) quando as biomassas foram tratadas termicamente a 170°C. Por outro lado, na digestão de uma terceira mistura, composta majoritariamente de *Microspora*, o maior rendimento de CH₄ foi observado a partir da biomassa aquecida a 110°C, cerca de 413 ml CH₄/g SV, enquanto que o menor potencial de produção foi relatado para biomassa de *Microspora* pré-tratada a 170°C. Desta forma, os autores concluíram que a solubilização da matéria orgânica não é o único fator diretamente inter-relacionado ao rendimento de CH₄. De forma semelhante, Jard *et al.* (2013) também relataram alta solubilização, porém rendimento reduzido de metano na digestão da macroalga *Palmaria palmata*, sujeita a temperaturas de 180-200°C como parte de um pré-tratamento termoquímico. O baixo potencial, da ordem de 220 ml CH₄/g SV à 200°C, foi atribuído à formação de compostos recalcitrantes na fração líquida durante a etapa de pré-tratamento (STRONG e GAPES, 2012; JARD *et al.* 2013).

A partir de técnicas de pré-tratamento hidrotérmico, aquele cuja temperatura é superior a 100°C e a pressão é reduzida gradualmente ao fim do tempo de exposição, Schwede *et al.* (2013) reportaram 108% de aumento no rendimento de CH₄ empregando *Nannochloropsis salina*. Este rendimento de 130 ml CH₄/g SV foi obtido a partir da fermentação da biomassa em um reator de mistura contínua (CSTR), mediante a aplicação prévia de calor a 120°C durante 2 h à biomassa de microalgas. Efeitos positivos de produção de CH₄ também foram relatados a partir de pré-tratamentos a baixas temperaturas (KINNUNEN *et al.* 2014). Na digestão anaeróbia de uma biomassa mista de *Pediastrum* sp., *Micractinium* sp. e *Scenedesmus* sp., Kinnunen e colaboradores (2014) conseguiram um aumento de 50% no rendimento de CH₄, aproximadamente 155 ml CH₄/g SV, a partir do congelamento da biomassa de microalgas a -20°C durante 24h, e posterior descongelamento à temperatura ambiente.

A variação no rendimento de CH₄, o aumento de solubilização e do potencial de produção de biogás podem ser atribuídos à temperatura do pré-tratamento, tempo de exposição, espécies de microalgas e composição bioquímica da parede celular. De acordo com estudos realizados, a solubilização da matéria orgânica alcançada com temperaturas superiores a 80°C são devido à desintegração da célula e à liberação

de material intracelular no meio aquoso; Ao passo que temperaturas inferiores a 70°C tem efeito de solubilização sobre exopolímeros e outros compostos extracelulares. (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012b, PASSOS e FERRER, 2014).

3.3.2 Pré-tratamento mecânico

Além do pré-tratamento térmico, técnicas de pré-tratamento mecânico também podem ser empregadas, com sucesso, na solubilização de células de microalgas, uma vez que exercem uma força física sobre as moléculas das células promovendo a sua ruptura. De acordo com Lee *et al.* (2012), os métodos mecânicos são geralmente os mais utilizados previamente ao processo de extração de lipídios na produção de biodiesel por apresentarem reduzida dependência de espécies de microalgas e baixa predisposição à contaminação, quando comparados aos pré-tratamentos químicos. No que diz respeito à potencialização da produção de biogás, incluindo CH₄, as metodologias mais disseminadas são ultrassom e micro-ondas.

No mecanismo de ultrassom, ondas de alta frequência (acima de 50 kHz) provocam uma rápida variação de pressão no interior das células, levando a movimentação de moléculas líquidas e consequente formação de microbolhas, regiões de vapor líquido. O fenômeno de cavitação originado promove dois efeitos físicos distintos: Micro turbulência e ondas de choque de velocidade e pressão. O primeiro proporciona uma intensa mistura intracelular, enquanto que o segundo causa a ruptura da parede. De forma similar, ondas de baixa frequência (inferiores a 50 kHz) e altas amplitudes levam à cavitação, capaz de promover reações químicas que destroem o material orgânico em função da alta temperatura e pressão. Forças de cisalhamento são criadas no líquido, propiciando a formação de radicais livres (H⁺ e OH⁻), induzindo a ruptura da célula e liberando o material do seu interior (IMAI *et al.* 2004; SCHWEDE *et al.* 2013).

Em experimento de digestão anaeróbia em escala piloto, Lee *et al.* (2014) relataram um aumento de 3 vezes de DQO solúvel, utilizada como medida direta de desintegração celular, a partir da aplicação de 2500 J/ml via ultrassom à biomassa de *Hydrodictyon reticulatum*, uma espécie filamentosa. Além do mais, quando a biomassa foi submetida à dose energética de 40 J/ml, o rendimento de CH₄ atingiu

384 ml CH₄/g SV, volume 2.3 vezes maior que obtido pela fermentação da biomassa *in natura*.

Na avaliação do potencial de solubilização de matéria orgânica a partir de aplicação de diferentes doses ultrassônicas e sua influência na cinética de digestão de uma cultura mista de microalgas cultivada em lagoa de alta taxa, Passos e Ferrer (2014) concluíram através de modelagem matemática que a desintegração celular ocasionada pelo pré-tratamento foi uma etapa essencial ao aumento do rendimento de CH₄. No estudo, as 9 doses de energia aplicadas que variaram entre 16 e 67,2 MJ/kg ST possibilitaram significativo aumento da solubilização da biomassa (16-91%) e rendimento máximo de CH₄ igual a 196,4 ml CH₄/g SV, como consequência da aplicação da dose ultrassônica máxima do experimento.

As micro-ondas variam em uma frequência de 0,3 a 300 GHz e atuam aumentando a energia cinética da água levando-a ao estado de fervura. A hidrólise celular é decorrente da polarização de macromoléculas provocada, principalmente, por mudanças na estrutura de proteínas através de uma súbita geração de calor e aumento da pressão no sistema biológico, forçando a saída de constituintes intracelulares da matriz biológica para o meio externo. Assim como para o mecanismo de ultrassom, o pré-tratamento via micro-ondas também tem efeitos térmicos e atérmicos. O efeito térmico se refere à geração de calor por meio da absorção de energia pela água e por complexos orgânicos. Já o efeito atérmico, é consequência da polarização das macromoléculas alinhada com os pólos do campo eletromagnético, promovendo a quebra potencial das pontes de hidrogênio. Um aspecto positivo dessa metodologia é que as micro-ondas penetram uniformemente na biomassa de microalgas, aquecendo todas as frações orgânicas de forma uniforme, sendo assim amplamente utilizada como uma etapa prévia à digestão anaeróbia, visando o aumento do potencial de produção de CH₄ (BANIK *et al.* 2006; ESKICIOGLU *et al.* 2009; PATIL *et al.* 2013).

No processo de irradiação via micro-ondas de uma cultura de *Nannochloropsis salina*, Schwede *et al.* (2013) reportaram um aumento no rendimento de metano de 347 ml CH₄/g SV para 487 ml CH₄/g SV, mediante a aplicação de uma frequência de

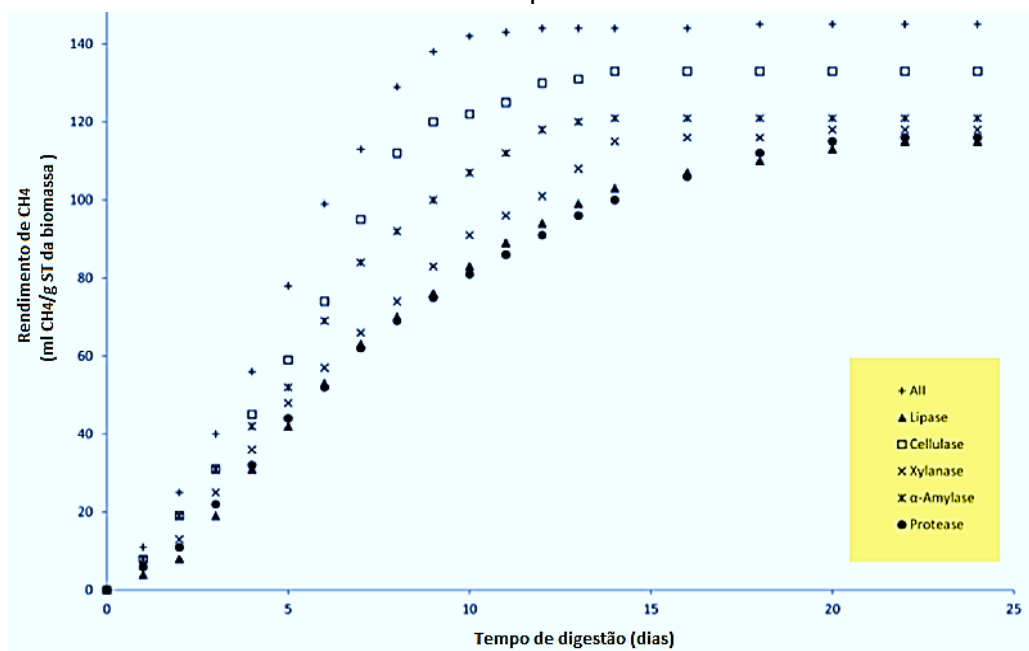
2450 MHz (5 vezes até alcançar o estado de ebulição a 900 W). Da mesma forma, através de testes de potencial bioquímico, Passos *et al.* (2013) alcançaram resultados ainda mais favoráveis, um aumento de 78% no rendimento de CH₄ a partir da digestão de biomassa de microalgas, proveniente de um sistema de tratamento de águas residuárias, submetida a 65,4 MJ/kg ST de irradiação e potência 900 W a 98°C. Em estudo subsequente, Passos *et al.* (2013b) investigando em escala laboratorial a digestão da biomassa de microalgas em reatores contínuos, reportaram um aumento de CH₄ de 30% (de 120 ml CH₄/g SV para 160 ml CH₄/g SV) para um TDH igual a 15 dias. Quando o TDH foi aumentado de 15 para 20 dias, o rendimento final de CH₄ foi de 200 ml CH₄/g SV, 43% maior à produção alcançada pelo reator controle de biomassa *in natura*. Como base no melhor desempenho obtido em testes de potencial bioquímico, em termos de rendimento de CH₄, a biomassa foi pré-tratada com dose ultrassônica de 110.2 MJ/kg VS, 900 W durante 3 min (PASSOS *et al.* 2013a).

3.3.3 Pré-tratamento biológico

As metodologias de pré-tratamento por via biológica são fundamentadas em 3 âmbitos: fúngico, bacteriano e enzimático. Diferentes espécies de fungos podem ser utilizadas para degradar, através da liberação de enzimas específicas, lignina, celulose e hemicelulose, constituintes comuns à parede celular algal. Por outro lado, apresenta-se o pré-tratamento microbiano, também conhecido como pré-acidificação, que é constituído da realização das etapas de hidrólise e acidogênese de forma dissociada às etapas de acidogênese e metanogênese na digestão anaeróbia. A separação de fases previne efeitos inibitórios à metanogênese, a exemplo da acumulação de ácidos graxos voláteis em baixo pH. Outro método de pré-tratamento biológico é a hidrólise enzimática, que consiste na adição de diferentes tipos de enzimas ou uma mistura delas, auxiliando nas reações de desintegração da parede celular das microalgas e de outros biopolímeros. A hidrólise enzimática não gera compostos recalcitrantes, e oferece baixo consumo de energia. Por outro lado, é um processo lento que apresenta altos custos relacionados a sua produção e elevada especificidade para o substrato da digestão (KUMAR *et al.* 2009; AGBOR *et al.* 2011; BOHUTSKYI *et al.* 2013; MONTGOMERY e BOCHMANN, 2014).

Ehimen *et al.* (2013) investigaram o potencial de produção de CH_4 de *Rhizoclonium* pré-tratada a partir da aplicação combinada de um processo de mistura mecânica ($<0,1$ mm de comprimento) e hidrólise enzimática com base em 5 enzimas diferentes (α -amilase, protease, lipase, xilanase e complexo de celulase). De acordo com os resultados, o maior potencial de produção de CH_4 , dentre as enzimas aplicadas, foi relatado a partir do pré tratamento com celulase, cerca de 133 ml CH_4/g ST; o grupo celulase atua sobre a decomposição da celulose, convertendo-a em um polissacarídeo mais simples como a glucose. Ademais, quando a biomassa foi pré-tratada a partir da aplicação de uma mistura proporcional entre todas as enzimas, o rendimento foi quase 10% superior, aproximadamente 145 ml CH_4/g ST (Figura 9). Mesmo assim, os autores relataram que os volumes produzidos foram consideravelmente baixos com relação aos resultados sobre digestão de algas reportados na literatura.

Figura 9 - Rendimento acumulado de CH_4 a partir digestão anaeróbia da biomassa de *Rhizoclonium* submetida a pré-tratamento enzimático



Fonte: Ehimen *et al.* (2013).

Em outro estudo, celulase, endogalacturonase, protease e esterase, e sua respectiva mistura, foram incubadas a 3 diferentes espécies de microalgas (*A. maxima*, *C. sorokiniana* e *S. obliquus*) por 24 h a 50°C. Todas as enzimas, individualmente, proporcionaram um incremento na produção de biogás. Contudo, os

melhores resultados foram observados a partir da hidrólise enzimática favorecida pela mistura entre todas as enzimas, com rendimentos máximos de biogás da ordem de 1050 ml/g SV, 775 ml/g SV e 1197 ml/g SV, para *A. maxima*, *C. sorokiniana* e *S. obliquus*, respectivamente. A hidrólise enzimática promoveu a solubilização das macromoléculas e biopolímeros da parede celular do substrato, e viabilizou o aumento da produção de CH₄ em comparação com a biomassa não pré-tratada (OMETTO *et al.* 2014).

3.3.4 Pré-tratamento químico

Mecanismos de pré-hidrólise celular ainda podem ser de natureza química. Estes aceleram o processo de degradação da biomassa de microalgas através da ação de agentes ácidos, alcalinos e oxidativos. Reagentes ácidos e alcalinos são habitualmente utilizados com a finalidade de solubilizar biopolímeros e compostos lignocelulósicos encontrados na parede celular microalgal, facilitando, sobretudo, a atuação de enzimas. A eficiência de cada tipo de pré-tratamento químico depende, essencialmente, da composição e da concentração dos constituintes da parede celular, bem como da concentração da solução química. O tratamento alcalino apresenta maior eficiência na degradação de lignina, enquanto que o tratamento ácido exhibe o melhor desempenho na solubilização química da hemicelulose (BOHUTSKYI *et al.*; CHO *et al.*; MENDEZ *et al.* 2013). Os pré-tratamentos por hidrólise química requerem baixa demanda de energia e alta solubilização de carboidratos como vantagens, todavia apresentam alto potencial de contaminação, geração de possíveis compostos inibitórios à digestão, problemas de corrosão e mudanças de pH no reator, além dos altos custos associados ao processo (PASSOS *et al.* 2014c; RODRIGUEZ *et al.* 2015).

A partir de pré-tratamento alcalino, diferentes concentrações de NaOH (0-21000 mg/L) foram aplicadas a 5 espécies de microalgas (*Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira weissflogii*, *Tetraselmis* sp., e *Pavlova*). Efeitos positivos sobre a solubilização foram observados apenas para biomassa de *Tetraselmis* sp., aproximadamente 200%. Não foram relatados aumentos significativos no rendimento de CH₄, embora uma queda de 10-30% no potencial de

produção tenha sido reportado na digestão de *Nannochloropsis* sp. (BOHUTSKYI *et al.* 2014).

Por outro lado, quando os mesmos autores investigaram a biodegradabilidade anaeróbia das mesmas espécies microalgais, pré-tratadas em combinação com um processo térmico (autoclavagem a 121°C por 30 min, pressão de 10,2 kgf/cm²), um aumento médio de 90% da DQO solúvel foi alcançado para as biomassas de *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp., e *Pavlova*, atribuído à combinação sinérgica entre alcalinidade e alta temperatura que leva ao inchaço da celulose e redução polimérica. Quanto aos rendimentos de biogás e CH₄, estes foram superiores em 30-40%, unicamente, na digestão de *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp., enquanto que nenhum incremento no potencial de produção de gás foi observado a partir das outras espécies.

Similarmente, por meio de pré-tratamento via termoquímica, a digestão da biomassa de *Chlorella vulgaris* rendeu 229 ml CH₄/g DQO inicial, resultando em um aumento de 65% em relação à biomassa *in natura*, quando acidificada com H₂SO₄ (pH = 2) seguida de autoclavagem a 120°C durante 40 min. Entretanto, o resultado mais positivo foi observado a partir do pré-tratamento exclusivamente térmico (120°C por 40 min), cerca de 268 ml CH₄/g DQO inicial. Desta forma, pré-tratamentos tão-somente químicos apresentam certa incoerência no que tange o aumento do potencial metanogênico, sendo apenas viáveis, de acordo com os resultados reportados na literatura, quando realizados em associação com mecanismos térmicos (MENDEZ *et al.* 2013).

3.4 Perspectivas Futuras

O item 3.4 discute perspectivas tecnológicas futuras acerca da digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias.

À face do exposto, várias questões ainda precisam ser elucidadas no aprimoramento das técnicas de digestão anaeróbia de microalgas tendo em vista a potencialização do rendimento de biogás e CH₄, e o escalonamento da tecnologia. Além da melhor compreensão acerca dos princípios atuantes nos mecanismos de pré-

tratamento para lise celular, é primordial conceber, sobretudo, um modelo energeticamente favorável e viável economicamente que integre o cultivo e o tratamento de efluentes, recuperação e concentração da biomassa cultivada, a produção de biocombustíveis, a digestão anaeróbia e a recuperação de nutrientes.

Em 2011, Yang e colaboradores apresentaram um modelo com processo em 2 estágios de produção de hidrogênio e CH_4 a partir da digestão anaeróbia de biomassa de *Scenedesmus* sp. pós extração de lipídios, e alcançaram um aumento de rendimento de biogás em 123%, obtendo um balanço energético positivo quando comparado ao processo em um estágio. Além desse modelo, ainda pode-se considerar a ampliação do potencial de rendimento de CH_4 a partir da implementação de técnicas de co-digestão com glicerol residual, lodo de esgoto ou outros resíduos ricos em carbono, a fim de intensificar a atividade anaeróbia através o aumento da relação C/N.

Atualmente, diversas pesquisas de caráter mundial estão sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar e modificar a acumulação de lipídios, macromoléculas e outros compostos de armazenamento energético em microalgas e cianobactérias por meio da engenharia genética. O emprego dessa tecnologia manipula propriedades genômicas e genéticas que diversificam e enriquecem a composição intracelular de microalgas e cianobactérias, favorecendo à acumulação de lipídios para produção de biocombustíveis e, conseqüentemente, potencializando o rendimento de biogás mediante fermentação anaeróbia da biomassa de espécies manipuladas geneticamente.

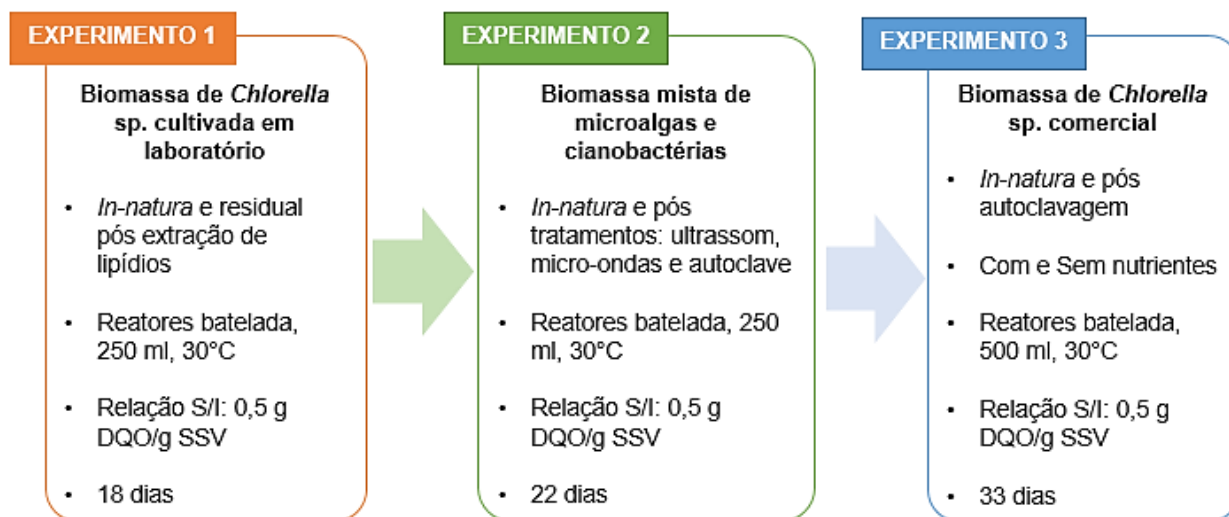
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, é exposta a metodologia utilizada para condução dos experimentos propostos de digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias.

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa de microalgas e cianobactérias para fins de produção de CH₄ foram conduzidos a partir de 3 experimentos distintos, os quais diferiram-se entre si, principalmente, em termos de tipo de substrato algal digerível e mecanismos de pré-tratamento aplicados à biomassa para lise celular, antecedentes à fase experimental.

Os testes partiram de uma perspectiva energética mais favorável (digestão de biomassa oriunda de um subprocesso produtivo - Experimento 1), passando pela digestão de uma biomassa mista proveniente de um reservatório natural eutrofizado (Experimento 2), até um cenário mais desfavorável (digestão de biomassa comercial favorecida com suplementação nutricional - Experimento 3), conforme Figura 10.

Figura 10 - Ensaios de biodegradabilidade metanogênica de biomassa de microalgas e cianobactérias



Fonte: O Autor (2017).

4.1 Metodologia comum aos 3 experimentos

O item 4.1 discorre sobre a metodologia que é comum aos 3 experimentos de digestão propostos.

4.1.1 Inóculo

O lodo metanogênico, utilizado nos 3 experimentos, foi obtido a partir de um reator UASB da estação de tratamento de efluentes de uma indústria cervejeira. Ele foi aclimatado à 30 °C por 48 horas (SURESH *et al.* 2013) e não foi adaptado à biomassa de microalgas antes do início do teste (SCHWEDE *et al.* 2013). Sua caracterização consistiu da determinação do pH, teor de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF), conforme APHA (2012). A Tabela 6 apresenta as características do lodo de inóculo.

Tabela 6 - Características do lodo de inóculo

Parâmetros	Valores
pH	7,5
Sólidos Totais (ST)	34,7 g/L
Sólidos Voláteis (SV)	30,0 g/L
Sólidos Fixos (SF)	4,7 g/L

Fonte: O Autor (2017).

4.1.2 Determinação do grau de solubilização

O grau de solubilização foi calculado a partir da relação entre sólidos dissolvidos totais e sólidos totais voláteis (SDT/STV) e pelo aumento dessa proporção em relação à biomassa *in-natura* (PASSOS *et al.* 2013a). A equação 1 apresenta o cálculo do grau de solubilização da biomassa de microalgas, onde os sub-índices “p” e “o” se referem às biomassas pré-tratada e *in-natura*, respectivamente.

(1)

$$\text{Solubilização (\%)} = \left\{ \frac{[(\text{SDT/STV})_p - (\text{SDT/STV})_o]}{(\text{SDT/STV})_o} \right\} \times 100$$

Onde: SDT: Sólidos Dissolvidos Totais; STV: Sólidos Totais Voláteis.

4.1.3 Caracterização do substrato

A caracterização da biomassa de microalgas *in-natura* e pré-tratada, bem como pós extração de lipídios e efluente da digestão, foi realizada conforme métodos analíticos enquadrados no *Standard Methods* (APHA, 2012), e estão identificados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Parâmetros e respectivos métodos analíticos realizados na caracterização da biomassa de microalgas e cianobactérias

Análises	Unidades	Métodos analíticos
Sólidos Totais (ST)	mg/L	Gravimétrico
Sólidos Voláteis (SV)	mg/L	Gravimétrico
Demanda Química de Oxigênio total (DQO total)	mg/L	Colorimétrico
Demanda Química de Oxigênio solúvel (DQO solúvel)	mg/L	Colorimétrico
Lipídios	mg/L	Adaptado de Soxhlet (1879)
Proteínas	mg/L	Prajapati <i>et al.</i> (2014) ¹
Carboidratos	mg/L	Trevelyan e Harrison (1952) ²
Nitrogênio Total (NTK)	mg/L	Titulométrico
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺)	mg/L	Titulométrico
pH	-	Condutivímetro
Condutividade Elétrica (CE)	μS/cm	Condutivímetro
Fósforo Total (PO ₄ ³⁻)	mg/L	Colorimétrico
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	mg/L	Cromatográfico
Hidroxi-Metil-Furfural (HMF)	mg/L	Cromatográfico ³
Sódio, Cálcio e Potássio (Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺)	mg/L	Fotometria de chama

Fonte: O Autor (2017).

¹A concentração total de proteínas foi determinada a partir da multiplicação do teor de nitrogênio total kjeldahl (NTK) pelo fator de conversão geral de 6,25 (PRAJAPATI *et al.* 2014).

²As análises de carboidratos foram realizadas de acordo com o método do reagente antrona proposto por Trevelyan e Harrison (1952). Os açúcares totais foram quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 625 nm, utilizando uma curva padrão de glicose (300 mg/L) de intervalo 0-300 mg/L. ³Determinação de Hidroxi-Metil-Furfural (HMF) por cromatografia líquida de alta eficiência, comprimento de onda de 254 nm, coluna C18, vazão de 0,6 ml/min, temperatura de 30°C, tempo de saída de 6 minutos e fase móvel 80:20 (acetoneitrila: água).

Tabela 8 - Parâmetros e respectivos métodos analíticos realizados na caracterização do efluente da digestão

Análises	Unidades	Métodos analíticos
Demanda Química de Oxigênio total (DQO total)	mg/L	Colorimétrico
Demanda Química de Oxigênio solúvel (DQO solúvel)	mg/L	Colorimétrico
Nitrogênio Total (NTK)	mg/L	Titulométrico
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺)	mg/L	Titulométrico
pH	-	Condutivímetro
Condutividade Elétrica (CE)	μS/cm	Condutivímetro
Fósforo Total (PO ₄ ³⁻)	mg/L	Colorimétrico
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	mg/L	Cromatográfico
Ácidos Graxos Voláteis (AGV)	mg/L	Cromatográfico
Alcalinidade	mg/L	Titulométrico

Fonte: O Autor (2017).

A caracterização consistiu, ainda, da visualização da suspensão de microalgas e cianobactérias em microscópio óptico binocular (marca Leica – CME 110v/220v) para identificação das espécies presentes e avaliação da integridade das células.

4.1.4 Potencial Estequiométrico de Metano (PEM)

O rendimento teórico de metano foi calculado a partir da equação 2, que toma como base a composição bioquímica da biomassa microalgal analisada em termos de lipídios, proteínas e carboidratos (PRAJAPATI *et al.* 2013).

(2)

$$PEM = \frac{(0,851 \times fp) + (1,014 \times fL) + (0,415 \times fC)}{100}$$

Onde: PEM = Potencial Estequiométrico de Metano esperado a partir da biomassa (L CH₄. g SV⁻¹); *fp*, *fL* e *fC*: Frações de proteínas, lipídios e carboidratos (% ST) da biomassa seca, respectivamente.

4.1.5 Medição da produção de metano

A produção de CH₄ foi monitorada através do método de deslocamento de líquido (solução de hidróxido de sódio 3%), que permite a quantificação direta do volume de CH₄ produzido diariamente. Cada reator esteve conectado por um sistema agulha-mangueira-agulha a uma garrafa invertida de 1 L contendo uma solução de NaOH 3%, que lavava o biogás produzido, retendo o CO₂ e permitindo apenas a passagem do gás metano (AQUINO *et al.* 2007; ESPOSITO *et al.* 2012).

O volume de metano foi quantificado a partir do volume de solução de NaOH 3% eliminado da garrafa e capturado por um frasco plástico de 1 L. Para avaliação da produção de metano realizada pela respiração endógena foram preparados reatores (em triplicata) como controles positivos (apenas inóculo) e controles negativos (alga *in-natura* e alga pré-tratada). Os valores de produção obtidos nos reatores contendo apenas o inóculo foram subtraídos dos obtidos nos reatores experimentais para obtenção do rendimento líquido (ml CH₄) corrigido para cada condição testada.

4.1.6 Biodegradabilidade

A biodegradabilidade anaeróbia (%) da biomassa de microalgas e cianobactérias foi determinada a partir do volume líquido de CH₄ (ml) e do rendimento teórico de metano sob condições padrões (350 ml CH₄/g DQO removida), sobre a DQO inicial de cada ensaio conduzido (PASSOS *et al.* 2013a).

(3)

$$\text{Biodegradabilidade (\%)} = \left\{ \frac{\left[\frac{\text{Volume líquido de CH}_4 \text{ (ml)}}{350 \text{ (ml CH}_4 \text{ /gDQO removida)}} \right]}{[\text{gDQO inicial}]} \right\} \times 100$$

4.1.7 Viabilidade energética

A avaliação dos aspectos energéticos da digestão anaeróbia nos 3 experimentos teve por objetivo investigar a viabilidade de implementação em larga escala dos mecanismos de pré-tratamento aplicados às biomassas de microalgas e cianobactérias, e foi realizada de acordo com o proposto por Ferrer (2009; 2011).

O balanço energético do pré-tratamento foi determinado a partir da relação energética E_e/E_s , onde E_e corresponde à energia consumida mediante aplicação da técnica de pré-tratamento, enquanto que E_s representa a quantidade de energia recuperada durante o processo de biometanização. Perdas de calor não foram consideradas no estudo, uma vez que, em reatores separados, representam uma parcela insignificante de gasto energético, cerca de 2 a 8% (ZUPANCIC e ROS, 2003).

Para as técnicas de pré-tratamento mecânico (ultrassom e micro-ondas) a energia de entrada foi quantificada a partir da Equação 4, onde E_e : entrada de energia (kJ/kg SV); P : Potência (kW); t : tempo de exposição (s); g SV: massa de sólidos voláteis da biomassa pré-tratada.

(4)

$$E_e = \frac{Pt}{g \text{ SV}}$$

Para determinação da quantidade de energia dispendida no pré tratamento térmico de autoclavagem nos experimentos 2 e 3 a Equação 5 foi empregada. Onde: E_e : energia de entrada (kJ/g SV); ρ : densidade (kg/L); V : volume da biomassa (L); T_p : Temperatura do pré-tratamento (°C); γ : calor específico (kJ/kg °C); T_d : Temperatura da digestão anaeróbia (°C); T_a : Temperatura ambiente (20°C); ϕ : Eficiência de recuperação de calor (85%); g SV: massa de sólidos voláteis da biomassa pré-tratada.

(5)

$$Ee = \frac{\left[(\rho V \gamma (T_p - T_a)) - (\rho V \gamma (T_p - T_d) \phi) \right]}{g \text{ SV}}$$

A saída de energia (Es) é calculada com base no aumento do rendimento de CH₄ a partir da aplicação do pré-tratamento com relação à biomassa *in natura* (Equação 6).

(6)

$$Es = \Delta Y_{CH_4} \xi$$

Onde: Es: Saída de energia (kJ/g SV); ΔY_{CH_4} : diferença no rendimento de CH₄ entre a biomassa pré-tratada e *in natura* (m³ CH₄/g SV; ξ : poder calorífico do CH₄ (35800 kJ/m³).

4.2 Experimento 1: Digestão de biomassa fresca de *Chlorella vulgaris*

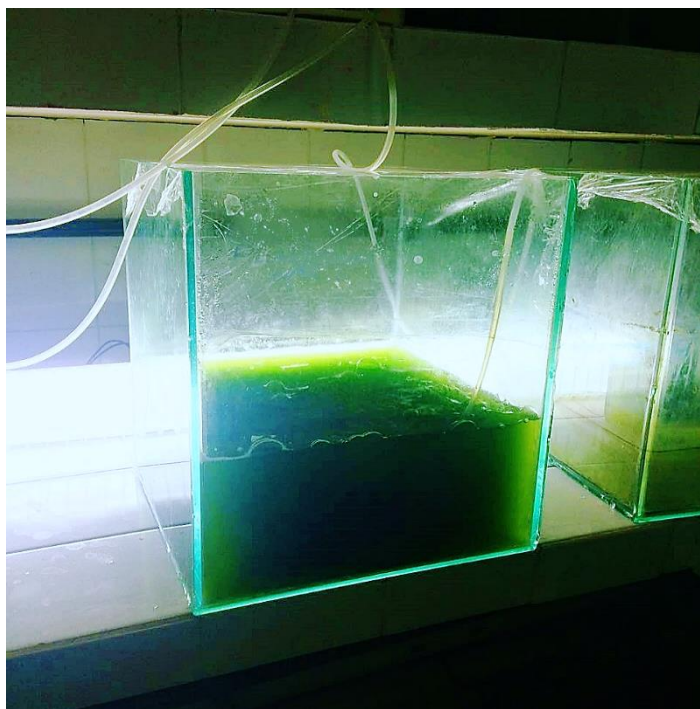
O item 4.2 apresenta, em detalhes, o delineamento do experimento 1.

4.2.1 Substrato

O cultivo de *C. vulgaris* foi realizado em fotobiorreatores retangulares, à temperatura de $17 \pm 2^\circ\text{C}$ para redução da probabilidade de proliferação fúngica e bacteriana, sobrepondo-se ao desenvolvimento do ecossistema de microalgas, e foi nutrido com meio Provasoli adaptado (Provasoli, 1958) e vitaminas do complexo B, volume de 1ml/L e 0,5 ml/L, respectivamente, fornecidos a cada 2 dias. A água de abastecimento foi utilizada para o cultivo inicial por possuir sais minerais dissolvidos e serem importantes para o metabolismo energético microalgal. Ela foi previamente desinfetada através da adição de dióxido de cloro (ClO₂) de concentração 10 ppm/L, e posteriormente desclorada por meio de bombas de aquário pelo período de 1 hora e pela adição de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), tornando-se própria para a finalidade de cultivo.

O cultivo foi mantido sob aeração constante de $0,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ com auxílio de bombas de aquário, mangueiras de silicone e pedras difusoras de ar, a fim de promover sua mistura total. Lâmpadas fluorescentes foram utilizadas para fornecer iluminação constante de $2000 \pm 100\text{lux}$, estabelecendo-se um foto-período autotrófico.

Figura 11 - Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores



Fonte: O Autor (2017).

O tempo de duração do cultivo foi de 60 dias, acumulando aproximadamente 12 L da suspensão de *Chlorella vulgaris*. A avaliação da produtividade da biomassa, em termos de rendimento (g de biomassa seca/L), foi determinada pela metodologia de sólidos totais (APHA, 2012).

Tendo em vista a concentração, a biomassa proveniente do cultivo foi submetida à decantação com auxílio de cones *Inhoff* com capacidade de 1L. Os cones foram mantidos em sala refrigerada durante o período de decantação (12 a 24 horas), e não receberam adição de coagulantes. Posteriormente, a biomassa bruta foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos (Centrifuge 5702 Eppendorf ®) e uma solução de aproximadamente 5 g de biomassa seca/L foi preparada.

4.2.2 Extração de lipídios

Para a extração dos lipídios da biomassa bruta de *C. vulgaris* foi empregado o método de extração Soxhlet (adaptado de Soxhlet, 1879) utilizando como solventes clorofórmio e metanol, na proporção (2:1 v/v). Cartuchos de celulose foram usados para retenção da biomassa no sistema. O tempo de extração do óleo variou de 8 a 10 horas, tempo necessário para que se completasse 12 ciclos de lavagem contínua. A mistura de solventes foi evaporada por meio de um retro evaporador mantida em banho-maria à temperatura de 60°C. A quantificação dos lipídios foi determinada por gravimetria.

Figura 12 - Extração de lipídios da biomassa de *Chlorella vulgaris* utilizando o método de extração Soxhlet



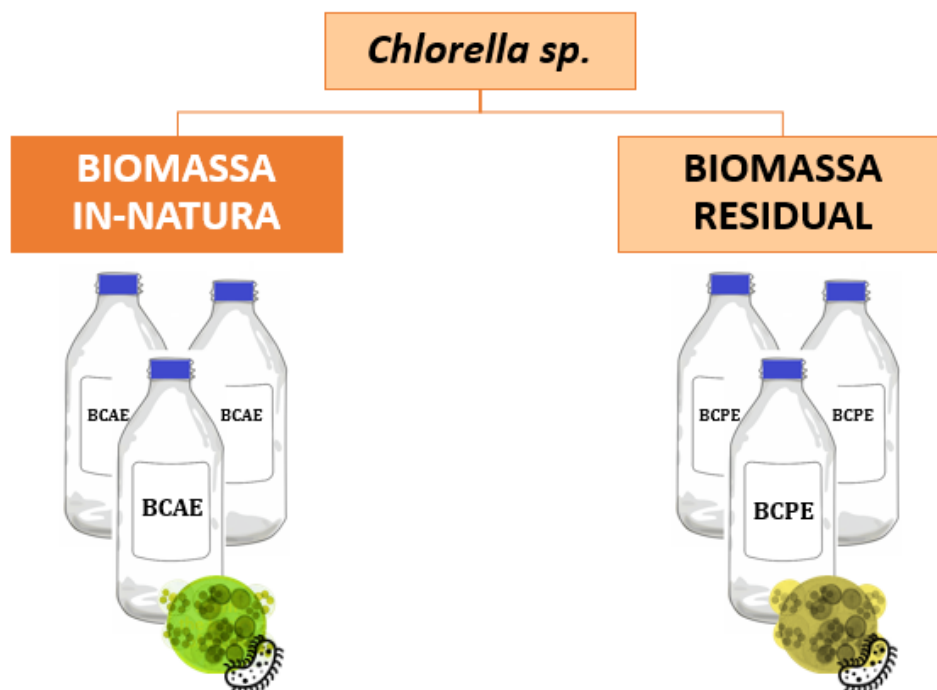
Fonte: O Autor (2017).

4.2.3 Instalação experimental

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa de *Chlorella vulgaris* foram realizados sob 2 condições: 1. Biomassa *in-natura* residual, originada do cultivo em laboratório, e 2. Biomassa residual pós-extração de lipídios (Figura 13). Foram utilizadas garrafas reatores de boro-silicato de 250 ml (em triplicata) que funcionaram como reatores em batelada com alimentação única e com headspace de 10% do volume útil. O rendimento de metano foi testado na faixa mesofílica à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, carga orgânica de 1,5 g DQO/L, relação S:I de 0.5 g DQO/g SSV (ALZATE

et al. 2012), e tempo de experimento de 18 dias. Suplementação extra com nutrientes não foi realizada em nenhuma das condições.

Figura 13 - Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia da biomassa *in-natura* e residual de *Chlorella vulgaris*



Legenda: BCAE (Ensaio com biomassa de *C. vulgaris* antes da extração); BCPE (Ensaio com biomassa de *C. vulgaris* pós extração).

Fonte: O Autor (2017).

4.3 Experimento 2: Digestão de biomassa mista de cianobactérias e microalgas

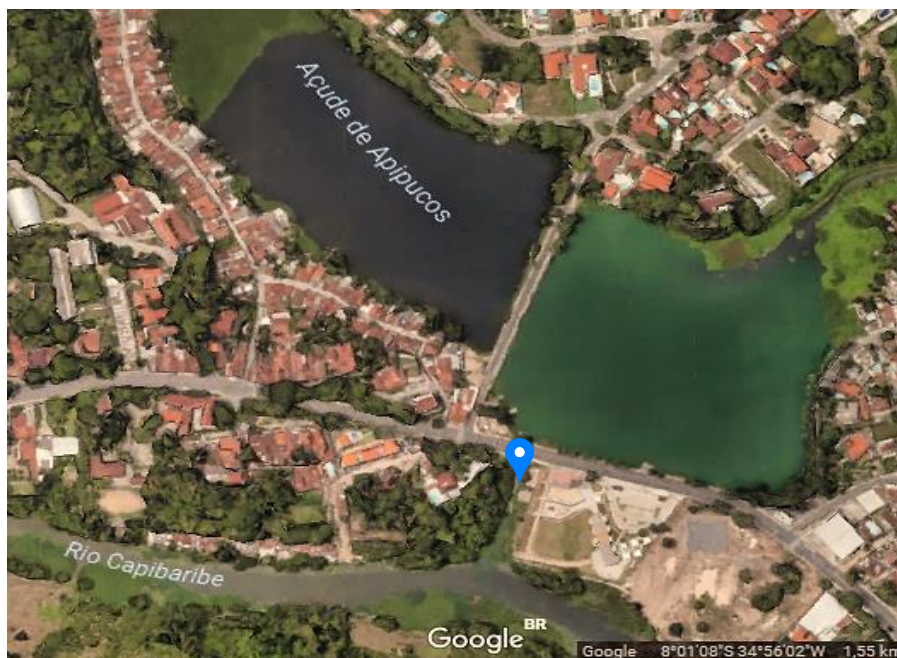
O item 4.3 apresenta, em detalhes, o delineamento do experimento 2.

4.3.1 Substrato

A biomassa utilizada no experimento era composta de uma cultura mista de cianobactérias e microalgas, 95% e 5%, respectivamente, e foi coletada no Açude de Apipucos (8°01'08"S; 34°56'02"O), localizado no bairro de Apipucos, cidade de Recife-PE. O reservatório mencionado possui área de 22 hectares, está interligado ao rio

Capibaribe e é enquadrado como Área de Preservação Ambiental - APA (RECIFE, 2006).

Figura 14 - Imagem de satélite do Açude de Apipucos



Fonte: Google Earth (2017).

A coleta foi realizada à jusante do vertedouro que conecta o açude ao rio em diferença de nível (Figura 15), e contou com o auxílio de uma rede de fitoplâncton (ϕ 30 cm x 70 cm de comprimento) com abertura de malha de 20 μ m conectada a um copo coletor de separação em PVC (volume de 200 ml). O processo de recuperação da biomassa em laboratório foi compreendido por uma combinação de etapas de sedimentação + centrifugação para concentração da biomassa, na qual coagulantes não foram adicionados e a biomassa foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos (Centrifuge 5702 Eppendorf®). Mais tarde, uma suspensão de aproximadamente 7000 mg de biomassa seca/L foi preparada.

Figura 15 – Fotografia do local de coleta da biomassa mista de microalgas e cianobactérias



Fonte: O Autor (2017).

No momento da coleta foram medidos os parâmetros pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE) e temperatura da água com auxílio de um medidor multiparâmetro portátil (Marca HACH, modelo HQ40d). Os valores estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros físico-químicos da água do Açude de Apipucos

Parâmetro	Valores
pH	7,3
Oxigênio Dissolvido	6,6 mg/L
Condutividade Elétrica	448 μ S/cm
Temperatura	26°C

Fonte: O Autor (19/07/2017).

4.3.2 Otimização dos pré-tratamentos

A otimização dos pré-tratamentos de ultrassom e micro-ondas foram realizados com o objetivo de se determinar as melhores doses de energia aplicadas à biomassa mista (MJ/kg ST) que garantiriam o maior aumento da DQO solúvel por dose de

energia fornecida, assumido como indicador direto de desintegração celular (variável resposta).

A dose de energia aplicada (E), expressa em MJ/kg ST, é função da potência (P), do tempo de exposição (t), do volume da amostra (V), e da concentração inicial de sólidos totais (ST), e é calculada de acordo com a Equação 7 (YAN *et al.* 2010).

(7)

$$E = \frac{P \times t}{V \times ST}$$

Amostras da biomassa mista de microalgas e cianobactérias foram submetidas à pré-hidrolise celular por meio de um banho ultrassônico de baixa frequência (25 KHz) e potência de 120 W (marca Unique, modelo USC – 1850 A, capacidade 3,6 L). 5 doses específicas de energia (20,6 MJ/kg ST, 61,8 MJ/kg ST, 103 MJ/kg ST, 144,2 MJ/kg ST e 206 MJ/kg ST) foram empregadas, em triplicatas, a 50 ml da biomassa mista com base no tempo de exposição e na concentração da suspensão da biomassa, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Condições dos ensaios de otimização do pré-tratamento ultrassônico de biomassa mista

Tempo ultrassônico (min)	Dose de Energia Aplicada (MJ/kg ST)	Temperatura (°C)
1	20,6	80
3	61,8	80
5	103,0	80
7	144,2	80
10	206,0	80

Fonte: O Autor (2017).

A otimização da dosagem do pré-tratamento mecânico de micro-ondas foi estabelecida a partir de forno micro-ondas de frequência 60 Hz e potência 900 W (marca Brastemp, modelo Maxi Gratine BMX35AR, capacidade 30 L). 5 doses específicas de energia (25,7 MJ/kg ST, 64,3 MJ/kg ST, 77,1 MJ/kg ST, 115,7 MJ/kg

ST e 154,3 MJ/kg ST) foram testadas (em triplicatas) para 50 ml de suspensão de biomassa. As condições do ensaio estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições dos ensaios de otimização do pré-tratamento de micro-ondas de biomassa mista

Tempo de Exposição (seg.)	Dose de Energia Aplicada (MJ/kg ST)
10	25,7
25	64,3
30	77,1
45	115,7
60	154,3

Fonte: O Autor (2017).

Já para determinação da melhor condição de hidrólise térmica de alta-pressão (HTAP), um autoclave vertical (marca Phoenix, linha 50 litros, pressão máxima de 3 kgf/cm²) foi utilizado. Desta forma, um planejamento fatorial 2² em duplicata (total de 8 ensaios) foi realizado, cuja as variáveis respostas também se deram em termos de concentrações (mg O₂/L) da DQO solúvel e seu respectivo aumento percentual, assumidos como indicadores diretos de desintegração celular. Na Tabela 12 encontram-se as condições dos ensaios e os níveis de trabalho do planejamento fatorial multivariado empregado.

Tabela 12 - Planejamento fatorial 2² para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem

Variável	Nível (-1)	Nível (+1)
Tempo	30 min	40 min
Temperatura	110°C	120°C

Fonte: O Autor (2017).

4.3.3 Condições finais dos pré-tratamentos

As condições finais dos pré-tratamentos de ultrassom, micro-ondas e autoclavagem para biomassa mista *in-natura* de microalgas e cianobactérias estão

discriminadas na Tabela 13. Elas apresentaram as respostas mais favoráveis à solubilização da biomassa estudada durante a fase de otimização dos pré-tratamentos (Seção 4.3.2).

Tabela 13 - Condições finais dos mecanismos de pré-hidrólise celular para biomassa mista

Pré-tratamento	Condições
Ultrassom	206 MJ/kg ST; 10 min
Micro-ondas	77,1 MJ/kg ST; 30 seg
Autoclavagem	120°C; 30 min; 1 kgf/cm ²

Fonte: O Autor (2017).

O pré-tratamento de ultrassom da biomassa mista *in-natura* foi conduzido em béqueres de 100 ml contendo 50 ml de amostra (7000 mg ST/L), irradiados por 10 minutos a 80°C recebendo uma dose total final de energia da ordem de 206 MJ/kg ST. De forma semelhante, o pré-tratamento via micro-ondas foi realizado, onde as amostras receberam uma quantidade de energia de 77,1 MJ/kg ST ao fim de 30 segundos de tempo de exposição.

Já o mecanismo de autoclavagem foi conduzido em garrafas de boro-silicato com volume total de 1 L, contendo 500 ml solução *in-natura* de suspensão de algas (7000 mg ST/L), as quais foram arranjadas (em triplicata) em autoclave vertical à temperatura de 120°C por 30 minutos e pressão de 1 kgf/cm² com queda brusca desta ao fim do tempo de exposição. Em seguida, as amostras foram esfriadas à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C.

4.3.4 Instalação experimental

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa mista de microalgas e cianobactérias foram realizados a partir de 4 condições distintas, considerando à indução a mecanismos de pré-hidrólise celular (Figura 16). Foram utilizadas garrafas reatores de boro-silicato de 250 ml (em triplicata) que funcionaram como reatores em batelada com alimentação única e com headspace de 10% do volume útil. O rendimento de metano foi testado na faixa mesofílica à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, carga

orgânica de 3 g DQO/L, relação S:I de 0.5 g DQO/g SSV (ALZATE *et al.* 2012), e tempo de experimento de 22 dias. Nutrientes não foram adicionados.

Figura 16 - Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade metanogênica de biomassa mista de microalgas e cianobactérias



Legenda: BMIN (Ensaio com biomassa mista in-natura); BMUS (Ensaio com biomassa mista pós ultrassom); BMMO (Ensaio com biomassa mista pós micro-ondas); BMAC (Ensaio com biomassa mista autoclavada).

Fonte: O Autor (2017).

4.4 Experimento 3: Digestão de biomassa comercial de *Chlorella* sp.

O item 4.4 apresenta, em detalhes, o delineamento do experimento 3.

4.4.1 Substrato

A biomassa liofilizada de *Chlorella* sp. foi obtida comercialmente e uma solução de aproximadamente 3 g ST/L foi preparada a partir do substrato desidratado obtido. Esta suspensão de algas recebeu agitação com velocidade constante por 30 minutos com o objetivo de garantir à suspensão certa solubilização inicial e homogeneização da biomassa seca, sendo, ao fim deste procedimento, identificada como uma solução de biomassa algal *in-natura* sem pré-tratamento.

Figura 17 - Biomassa comercial liofilizada de *Chlorella* sp.



Fonte: O Autor (2017).

4.4.2 Solução de nutrientes

A solução nutritiva utilizada neste estudo segue as concentrações propostas por FLORENCIO (1993) e podem ser observadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Concentração de reagentes em solução de nutrientes

Solução	Reagente	Concentração (g/L)
Macronutrientes	NH ₄ Cl	0,280
	K ₂ HPO ₄	0,252
	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,100
	CaCl ₂	0,007
	NaHCO ₃	0,400
	Extrato de levedura	0,100
Micronutrientes	FeCl ₂ .4H ₂ O	2,000
	ZnCl ₂	0,050
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,500
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,142
	NaSeO ₃ .5H ₂ O	0,164
	H ₃ BO ₃	0,050
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,000
	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,090
	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,050
	EDTA	1,000
	Resazurina	0,200
	HCl	1,000 (m/L)

Fonte: FLORENCIO (1993).

4.4.3 Otimização do pré-tratamento

Ensaio preliminares de autoclavagem foram realizados com o objetivo de determinar os melhores tempos de exposição e temperaturas que potencializariam os efeitos do pré-tratamento, promovendo a lise da parede celular, e consequente disponibilidade de material orgânico de fácil assimilação. A seleção do tempo de exposição e da temperatura do pré-tratamento de autoclavagem foi resultado de um planejamento fatorial 2^2 em duplicata (total de 8 ensaios), cujas respostas foram as concentrações finais (mg/L) e aumento (%) de DQO solúvel na suspensão de *Chlorella* sp. Na Tabela 15 encontram-se as condições dos ensaios e os níveis de trabalho do planejamento fatorial multivariado empregado.

Tabela 15 - Planejamento fatorial 2^2 para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem

Variável	Nível (-1)	Nível (+1)
Tempo	30 min	40 min
Temperatura	110°C	120°C

Fonte: O Autor (2017).

4.4.4 Pré-tratamento térmico de autoclavagem

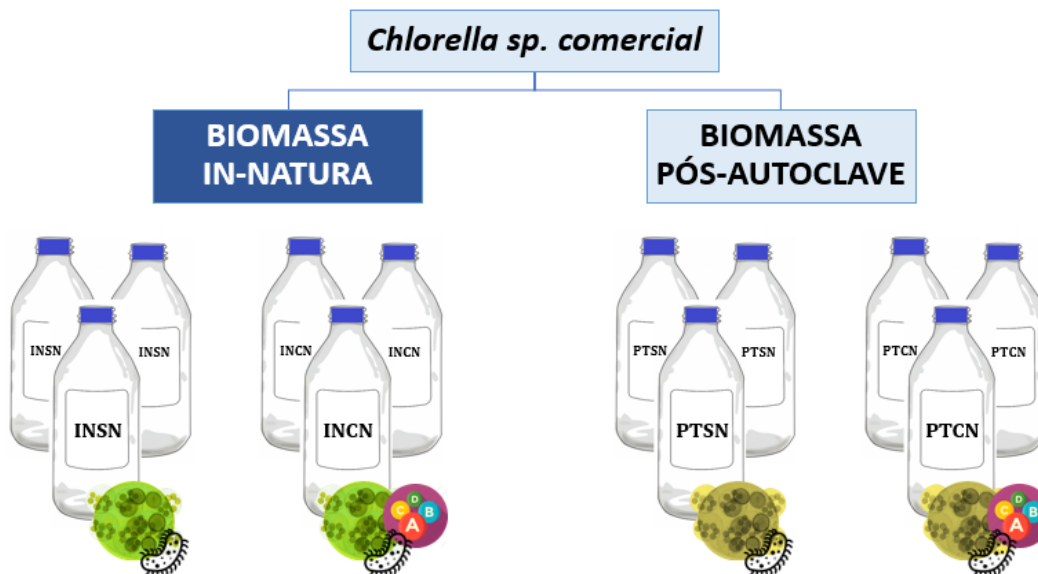
O pré-tratamento térmico de autoclavagem da biomassa algal *in-natura* foi conduzido em garrafas de boro-silicato com volume total de 1 L, contendo a solução de suspensão de algas, as quais foram arranjadas (em triplicata) em autoclave vertical (marca *Phoenix*, linha 50 litros, pressão máxima de 3 kgf/cm²) à temperatura de 120°C, tempo de exposição de 40 minutos, pressão de 1 kgf/cm² com queda brusca ao fim do tempo de exposição. Esta condição apresentou a resposta mais favorável à solubilização da biomassa de microalgas durante a fase de otimização do pré-tratamento, preliminar à fase experimental (seção 4.4.3).

4.4.5 Instalação experimental

Os ensaios de biodegradabilidade metanogênica da biomassa comercial de *Chlorella* sp. foram realizados a partir de 4 condições díspares, em termos de adição ou não de nutrientes, e condução ou não a pré-tratamento térmico de autoclavagem para lise celular, conforme Figuras 18 e 19. Foram utilizadas garrafas reatores de

boro-silicato de 500 ml (em triplicata) que funcionaram como reatores em batelada com alimentação única e com headspace de 10% do volume útil. O rendimento de metano foi testado na faixa mesofílica à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, carga orgânica de 2 g DQO/L, relação S:I de 0.5 g DQO/g SSV (ALZATE *et al.* 2012), e tempo de incubação de 33 dias.

Figura 18 - Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade metanogênica de *Chlorella sp.*



Legenda: INSN (Ensaio com alga in-natura sem adição de nutrientes); INCN (Ensaio com alga in-natura com adição de nutrientes); PTSN (Ensaio com alga pré-tratada sem adição de nutrientes); PTCN (Ensaio com alga pré-tratada com adição de nutrientes).

Fonte: O Autor (2017).

Figura 19 - Aparato experimental para monitoramento da produção diária de CH_4



Fonte: O Autor (2017).

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO 1

A seção 5.1 discute, em detalhes, os resultados do experimento 1.

5.1.1 Caracterização da biomassa e efeito do processo de extração de lipídios

A Tabela 16 apresenta a composição bioquímica da biomassa *in natura* e pós extração de lipídios de *Chlorella vulgaris*. Houve uma redução do teor lipídico do substrato residual em comparação com a biomassa íntegra da ordem de 65%. Desta forma, houve um aumento proporcional das frações macromoleculares de proteínas e carboidratos na biomassa remanescente, sendo estas iguais a 55,4% e 21,7%, respectivamente. Estes valores estão em conformidade com estudos realizados por Bruton *et al.* (2009) e Sidney *et al.* (2010), os quais sustentam que os teores de proteínas e carboidratos para diversas espécies de *Chlorellales*, como *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris*, situam-se na faixa de 41 a 58% e 12 a 26%, respectivamente.

Tabela 16 - Caracterização da biomassa de *Chlorella vulgaris*

Parâmetros	BCAE	BCPE
Sólidos Totais (ST)	7200 mg/L	5900 mg/L
Sólidos Voláteis (SV)	5800 mg/L	5300 mg/L
SV/ST	73%	90%
DQO bruta	5400 mg/L	4245 mg/L
DQO solúvel	325 mg/L	498 mg/L
DQOs/DQOb	6%	11,73%
Lipídios	11% ST	3,8% ST
Proteínas	44,1% ST	55,4% ST
Carboidratos	18,4% ST	21,7% ST
NTK	508 mg/L	522 mg/L
NH ₄ ⁺	20 mg/L	35 mg/L
pH	6,9 ± 0,1	7,1 ± 0,08
CE	750 µS/cm	753 µS/cm
SO ₄ ²⁻	2,7 mg/L	4,1 mg/L
PO ₄ ³⁻	7,3 mg/L	8,8 mg/L
Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	6,2; 5,8; 1,9 mg/L	6,4; 4,7; 2,0 mg/L

BCAE: Biomassa de *Chlorella vulgaris* antes da extração de lipídios.

BCPE: Biomassa de *Chlorella vulgaris* pós extração de lipídios.

Fonte: O Autor (2017).

A presença de lipídios na biomassa residual de *Chlorella vulgaris* aponta limitações do método de extração empregado, as quais podem estar relacionadas à baixa biodegradabilidade da parede celular microalgal inerente ao processo. Espécies de *Chlorella vulgaris* apresentam parede celular rígida, composta, sobretudo, de celulose, hemicelulose e lignina. Lee *et al.* (2013) defendem que uma etapa de pré tratamento, anterior à extração, seja realizada a fim de facilitar o acesso ao interior da célula, e otimizar a reação do solvente com os lipídios, aumentando a eficiência do processo de obtenção do óleo.

Entretanto, o aumento da relação SV/ST de 73% para 90% na biomassa residual e do grau de solubilização da ordem de 36% constatado, indica que o processo de extração lipídica atuou também como um pré-tratamento da biomassa *in natura*. Mesmo que o processo de extração de lipídios não tenha causado a

desintegração integral da célula, ele pode ter atuado como um agente danoso à superfície da mesma. Um indicativo para este fato é o incremento da relação DQO s/DQOb em aproximadamente 96%, mediante o aumento da disponibilidade de material orgânico mais facilmente assimilável pelo consórcio bacteriano anaeróbio, de 325 mg O₂/L para 498 mg O₂/L.

Figura 20 - Células de *Chlorella vulgaris in natura* e pós extração de lipídios visualizadas em microscópio óptico (400x)

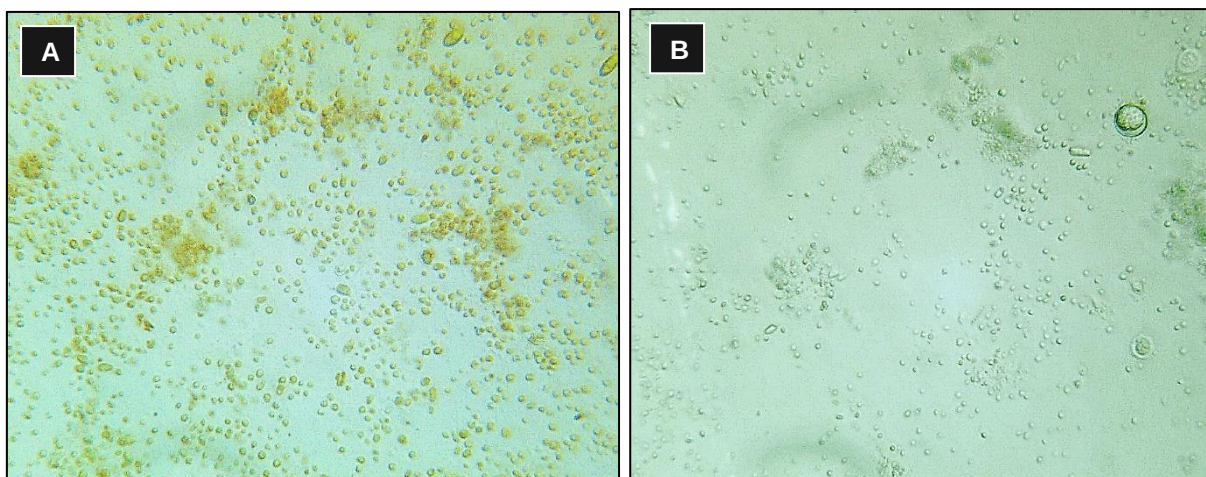


Figura 20A: Biomassa de *C. vulgaris in natura*; Figura 20B: Biomassa de *C. vulgaris* pós extração de lipídios.

Fonte: O Autor (2017).

De acordo com a Figura 20, é possível identificar que houve uma redução clara da densidade de células entre as duas condições, como consequência do processo de extração dos lipídios. Outra particularidade observada na biomassa residual, foi a atenuação da coloração verde, característica às clorofíceas. Pigmentos como clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas acumulados por *C. vulgaris* foram, muito provavelmente, destituídos da biomassa *in natura* após sucessivos ciclos de lavagem com solvente orgânico para obtenção do óleo.

Tomando como base os valores de C e N apresentados na Tabela 16, foi possível determinar que as relações C/N foram de aproximadamente 11:1 para biomassa sem extração e de 8:1 para os resíduos de *Chlorella vulgaris*. Essas relações indicam que não há limitação de N, porém apontam um desequilíbrio entre os requisitos de carbono e nitrogênio para a comunidade bacteriana anaeróbia, uma vez que são inferiores a relação ideal de 20:1. Esta desproporção pode levar à

liberação de nitrogênio sob forma de amônia livre durante a digestão, sendo inibidora às bactérias metanogênicas e resultando na acumulação de ácidos orgânicos dentro do reator.

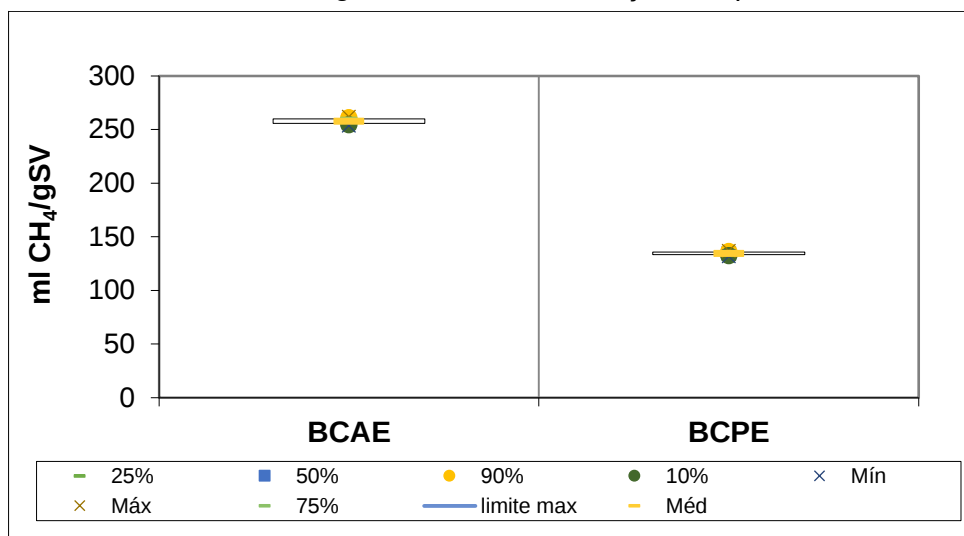
No entanto, foram observadas baixas concentrações de NH_4^+ para as duas condições de substrato de microalgas. Com teores que não ultrapassaram os 30 mg NH_4^+ /L associados aos valores de pH próximos à neutralidade (6,9 – 7,1), pode-se dizer que essas concentrações quase que prontamente satisfazem os requisitos mínimos da comunidade bacteriana associada à digestão anaeróbia no que se refere à amônia, visto que encontram-se próximas a 50 mg NH_4^+ /L (PARKIN *et al.* 1986).

As relações DQO/ SO_4^{2-} estiveram dentro do intervalo 1000:1 – 2000:1 para ambos substratos, sendo assim extremamente favoráveis às metanogênicas e não representando risco de competição junto às bactérias redutoras de sulfato (BRS) na digestão anaeróbia. As baixas concentrações de sulfato da ordem de 2,7 mg SO_4^{2-} /L e 4,1 mg SO_4^{2-} /L tem efeitos positivos sobre o metabolismo celular das bactérias metanogênicas.

5.1.2 Produção de CH_4 e biodegradabilidade do substrato

Os rendimentos máximos de CH_4 , obtidos aos 16 dias de experimento, foram de 256 ml CH_4 /g SV e 138 ml CH_4 /g SV para biomassa *in natura* e residual de *Chlorella vulgaris*, respectivamente (Figura 21).

Figura 21 - Rendimento de CH₄ na digestão anaeróbia de biomassa de *Chlorella vulgaris* com e sem extração de lipídios



BCAE: Biomassa de *Chlorella vulgaris* antes da extração de lipídios;

BCPE: Biomassa de *Chlorella vulgaris* pós extração de lipídios.

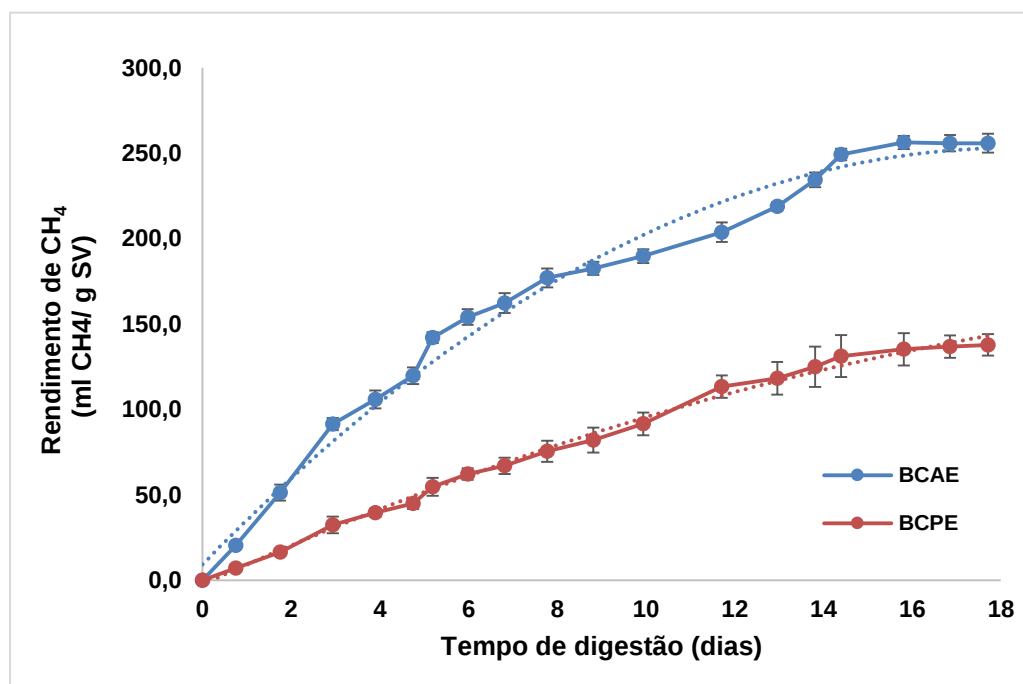
Fonte: O Autor (2017).

Os rendimentos reais de CH₄ foram inferiores aos valores de Potencial Estequiométrico de Metano (PEM) estimados para ambas condições de substrato. Para a fermentação metanogênica da biomassa *in natura*, o PEM foi da ordem de 562 ml CH₄/g SV, enquanto que para os resíduos de *C. vulgaris*, esse valor foi de 600 ml CH₄/g SV. Os números reais de produção de metano representaram cerca de 46% e 23% dos valores teóricos calculados com base na estimativa proposta por Prajapati *et al.* (2013). Visivelmente, o PEM superestima a produção de metano. Isso acontece, porque assume que a conversão de sólidos voláteis a biogás acontecerá em sua totalidade, e, ainda, desconsidera as necessidades de manutenção bacteriana celular e anabolismo. Embora a fração de lipídios represente o maior potencial teórico de metano em comparação com proteínas e carboidratos, a sua redução não diminuiu o rendimento teórico de CH₄ calculado a partir da biomassa residual de *C. vulgaris*, uma vez que as frações de macromoléculas nos resíduos aumentaram proporcionalmente com o processo de extração.

As produções diárias acumuladas de CH₄ para biomassa fresca de *Chlorella vulgaris in natura* e pós extração de lipídios estão apresentadas na Figura 22. Para ambos os casos, a fase lag foi praticamente inexistente, uma vez que a relação S:I de 0,5 g DQO/g SSV foi suficiente para permitir a rápida degradação do substrato

operada por um alto volume de bactérias anaeróbias. A digestão anaeróbia da biomassa residual foi capaz de render aproximadamente 54% do volume de CH₄ alcançado a partir fermentação da biomassa *in natura* inteira.

Figura 22 - Produção acumulada de CH₄ na digestão anaeróbia de biomassa de *Chlorella vulgaris* com e sem extração de lipídios (S/l: 0,5)



BCAE: Biomassa de *C. vulgaris* antes da extração de lipídios;

BCPE: Biomassa de *C. vulgaris* pós extração de lipídios.

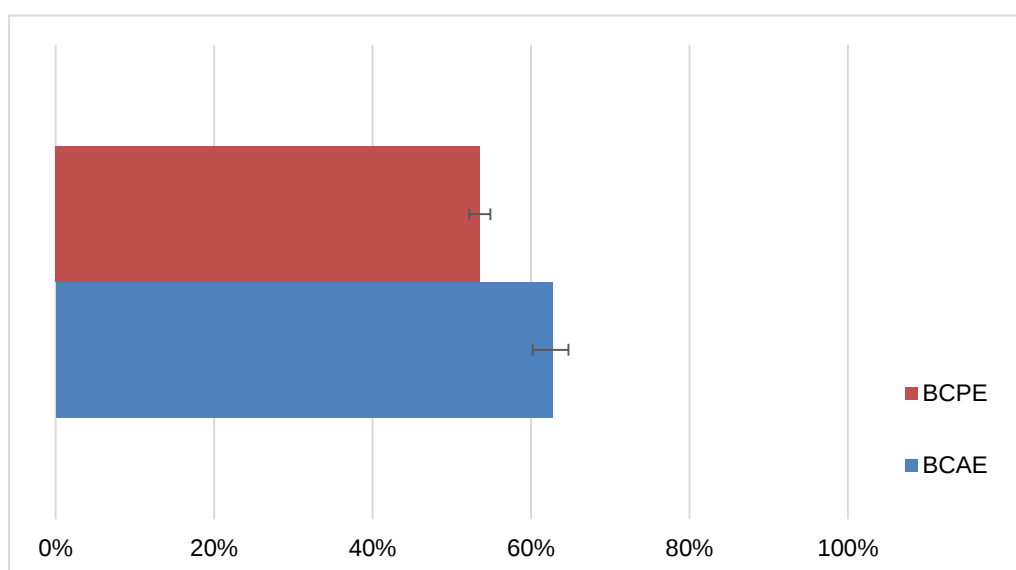
Fonte: O Autor (2017).

A produção de CH₄ obtida para a biomassa residual foi moderadamente inferior (8 – 15%) àquelas evidenciadas por Tercero *et al.* (2014), Rodriguez *et al.* (2015) e Sforza *et al.* (2017) também na digestão de *C. vulgaris* pós extração lipídica. Uma explicação para este fato é que, nesses estudos, alguns mecanismos de hidrólise celular, como ultrassom e autoclavagem, foram empregados aos resíduos microalgais anterior à digestão, favorecendo o rendimento de CH₄. Esta justificativa é válida também para os altos volumes de CH₄/g SV alcançados por Lu *et al.* (2009) e Park *et al.* (2013), com produções da ordem de 403 ml CH₄/g SV e 440 ml CH₄/g SV, respectivamente. No entanto, em termos de rendimento de CH₄ a partir da fermentação de *Chlorella vulgaris in natura*, não submetida a nenhum tipo pré-tratamento, o resultado obtido, embora superior, foi bastante coerente com estudos realizados anteriormente, 218 ml CH₄/g SV (MUSSGNUM *et al.* 2010), 230 ml CH₄/g SV (PARK *et al.* 2013), 191 ml CH₄/g DQO (MAHDY *et al.* 2014) em reatores do tipo

batelada. Uma justificativa para rendimento de 256 ml CH₄/g SV, superior em cerca de 20% à média das produções nos estudos anteriormente citados, pode ser a proporção de frações moleculares da biomassa, característica da parede celular formada e as condições de crescimento. As concentrações dos reagentes do meio Provasoli e a frequência de suplementação durante o cultivo pode ter aumentado o potencial bioquímico de conversão das macromoléculas da biomassa de *C. vulgaris* a metano. Outros fatores que devem ser levados em consideração são as condições operacionais dos reatores, como a temperatura, pH, relação C/N, concentração de NH₄⁺ e presença de inibidores.

Apenas uma moderada parcela do substrato disponível para digestão foi biodegradada durante os ensaios anaeróbios (Figura 23).

Figura 23 - Percentual de biodegradabilidade da biomassa de *Chlorella vulgaris* nos ensaios de digestão



BCAE: Biomassa de *Chlorella vulgaris* antes da extração de lipídios;

BCPE: Biomassa de *Chlorella vulgaris* pós extração de lipídios.

Fonte: O Autor (2017).

Conforme mostra a Figura 23, a biodegradabilidade anaeróbia média da biomassa íntegra de *C. vulgaris* foi de 63%, enquanto que para a biomassa residual este valor foi de 54%. Posto isto, é possível inferir que limitados rendimentos de CH₄ associados à baixa biodegradabilidade da biomassa sugerem que alguns fatores atuaram como inibidores parciais do processo de digestão.

No que se refere à biomassa de células *in natura* não lisadas, a resistência da parede celular ao ataque enzimático bacteriano pode ter comprometido a etapa de hidrólise, e, conseqüentemente, as outras fases da digestão anaeróbia. Sanchez-Hernandez e Trvieso-Córdoba (1993) encontraram células intactas de *Chlorella vulgaris* dentro de um digestor anaeróbio após o tempo de retenção hidráulico de 30 dias. Embora mecanismos de pré-tratamento celular pudessem ser aplicados à suspensão de *C. vulgaris*, estes estariam fora do escopo deste ensaio, especificamente, o qual avalia a produção de CH₄ para recuperação de energia e nutrientes, numa perspectiva energética mais favorável.

No que diz respeito à fermentação dos resíduos microalgais da extração, esta pode ter sido afetada pelo método de extração de lipídios empregado. Reduções significativas na produção de biogás devido ao clorofórmio (CHCl₃) residual utilizado como solvente foram relatadas em alguns estudos (EHIMEN, 2009; YUN *et al.* 2014). Na investigação sobre o efeito inibitório de CHCl₃ residual na digestão de *Chlorella vulgaris* pós extração de lipídios, YUN *et al.* (2014) relataram que a partir de concentrações de 10 mg CHCl₃/L, a produção de CH₄ decresceu significativamente, enquanto que em concentrações iguais a 25 mg CHCl₃/L e 100 mg CHCl₃/L apresentaram potenciais de inibição da produção de CH₄ em 50% e 100%, respectivamente. O clorofórmio residual do método de extração inibe o processamento metabólico de AGV pelas metanogênicas, levando à acumulação, principalmente, de acetato e lactato no reator; as metanogênicas são extremamente sensíveis a compostos químicos e calor.

Etapas de enxágue e evaporação do clorofórmio devem ser fortemente consideradas antes da fase experimental de fermentação. Ademais, outros métodos não-tóxicos de extração lipídica podem ser empregados, como a extração subcrítica por água, por exemplo. No entanto, esses processos envolvem altos custos e baixa eficiência, quando em comparação com os métodos convencionais utilizados para extração de lipídios (ATADASHI *et al.* 2011).

Muito embora a extração lipídica tenha atuado como um mecanismo de pré-hidrólise química, e contribuído para a biodegradabilidade da biomassa residual,

testes adicionais são necessários para elucidar os mecanismos atuantes na deterioração de células de microalgas a partir de diferentes solventes e sua influência na produção de biogás.

As baixas relações C/N (8:1 e 11:1) nas duas condições podem ter desfavorecido o potencial de produção de CH₄ pelo consórcio anaeróbio dentro dos reatores. Uma relação C/N ótima situa-se dentro do intervalo 20:1 e 25:1 (YEN e BRUNE, 2007). Uma alternativa para o aumento da relação C/N é a co-digestão do substrato de algas com diferentes tipos de resíduos orgânicos. É uma tecnologia bem aceita que ajuda na digestibilidade e produção de CH₄ por meio da sinergia química e biológica e efeitos complementares que compensam a falta de carbono e nutrientes. Um modelo interessante é a co-digestão de microalgas com glicerol. Lopez *et al.*; Salerno *et al.*; Ehimen *et al.* (2009) constataram o aumento médio de 32% no rendimento de CH₄ a partir da co-digestão de diferentes biomassas microalgais mediante co-digestão anaeróbia com glicerol residual. O glicerol é um subproduto rico em carbono oriundo das reações de transesterificação de lipídios para produção de biodiesel, grandes quantidades desse resíduo são geradas diariamente.

5.1.3 Efluente da digestão

O digerido da fermentação anaeróbia de *Chlorella vulgaris* apresentou, como previsto, altas concentrações de íon amônio (NH₄⁺) e fosfato (PO₄³⁻) (Tabela 17). Na avaliação das concentrações finais de NH₄⁺, um aumento de 16 vezes foi observado para a biomassa íntegra controle, enquanto que para a biomassa residual o aumento foi de 10 vezes. Embora o maior incremento das concentrações tenha sido observado a partir da biomassa controle, a maior concentração final de NH₄⁺ foi alcançada pelos reatores com resíduos da extração lipídica de *C. vulgaris*, sendo da ordem de 393 mg NH₄⁺/L. Naturalmente, essas concentrações foram maiores pela digestão de material orgânico de base proteica (44-55% ST da biomassa seca), sendo potencializadas nos reatores com biomassa residual, cujas concentrações de proteínas aumentaram proporcionalmente.

Também foram observados aumentos nas concentrações de NTK, cerca de 25 vezes para biomassa *in natura* e de 23 vezes para biomassa residual, sendo que em

consequência do meio reduzido (H^+) e da composição bioquímica do substrato, quase que toda a totalidade do NTK existente foi encontrado na forma solúvel (91-94%); o aumento da mineralização do N esteve fortemente correlacionado à produção de CH_4 . Do mesmo modo, Bohutskyi *et al.* (2015) constataram que a digestão anaeróbia de *Nannochloropsis salina* e *A. protothecoides* pós-extração de lipídios levou à significativa liberação de NH_4^+ no efluente da digestão, cerca de 28 a 40% da biomassa total, respectivamente.

Tabela 17 - Caracterização do efluente da digestão de *C. vulgaris*

Parâmetros	BCAE	BCPE
pH	6,8 ± 0,1	6,9 ± 0,1
Potencial Redox	-287 mV	-298 mV
DQO solúvel	180,9 mg/L	158,2 mg/L
AGV	13,2 mg/L	41,7 mg/L
Alcalinidade	648,4 mg/L	619,1 mg/L
AGV/ALC	0,02	0,07
NTK	381,2 mg/L	418,6 mg/L
NH_4^+	346,8 mg/L	393,3 mg/L
PO_4^{3-}	40,3 mg/L	43,4 mg/L
SO_4^{2-}	8,3 mg/L	9,1 mg/L

BCAE: Biomassa de *C. vulgaris* antes da extração;

BCPE: Biomassa de *C. vulgaris* pós- extração.

Fonte: O Autor (2017).

As concentrações finais de PO_4^{3-} foram 40,3 mg PO_4^{3-} /L e 43,4 mg PO_4^{3-} /L, sendo superiores às iniciais em 4,6 vezes e 3,9 vezes, para reatores com biomassa *in natura* e pós extração lipídica, respectivamente, evidenciando a alta solubilização de fósforo.

Collet *et al.* (2010) relataram concentrações de 2940 mg NH_4^+ /L e 390 mg PO_4^{3-} /L no efluente da digestão de biomassa de microalgas, como parte da avaliação de um sistema combinado de cultivo e produção de biogás. No entanto, tais concentrações se encontraram em níveis moderados de inibição por amônia (PARKIN e OWEN, 1986). Por outro lado, Zamalloa e colaboradores (2012) registraram

concentrações de nutrientes de 546 mg NH_4^+ /L e 141 mg PO_4^{3-} /L no digerido anaeróbio de microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum*, estando estes valores mais próximos aos obtidos neste estudo. Os resultados encontrados validam o alto potencial do efluente da digestão de *C. vulgaris* do ponto de vista nutricional, encontrando-se bem próximos à faixa ideal da relação N:P (10 - 17:1) empregada no cultivo de espécies de microalgas, sendo estas da ordem média de 9,7:1 para ambos sobrenadantes da digestão.

Quanto à redução de DQO solúvel, esta foi da ordem 80% para os reatores com biomassa *in natura*, e mais de 200% para reatores com resíduos de *C. vulgaris* pós extração, quando comparados com os valores de DQO solúvel apresentados na Tabela 16. A concentração de AGV nos reatores com biomassa residual foi da ordem média de 41,7 mg AGV/L, superiores em 2 vezes às encontradas nos reatores com biomassa *in natura*, com destaque para o ácido acético, consistindo em cerca de 77%. Esse acúmulo se deu, muito provavelmente, em função do clorofórmio residual proveniente da extração de lipídios, o qual teve efeito nocivo sobre a cinética metabólica das bactérias metanogênicas. No entanto, as relações AGV/ALC foram próximas de zero devido à alta alcalinidade, sugerindo que, mesmo assim, o consumo de ácidos orgânicos se dava quase à mesma taxa em que esses ácidos eram produzidos.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO 2

A seção 5.2 discute, em detalhes, os resultados do experimento 2.

5.2.1 Otimização dos pré-tratamentos

O pré-tratamento da biomassa mista de microalgas e cianobactérias por meio do banho ultrassônico de frequência 25 KHz e potência de 120 W aumentou a DQO bruta e solúvel da biomassa sob todas as condições testadas. O incremento da concentração de DQO solúvel variou entre 0,5% e 17,4% com relação à biomassa *in natura* controle (Tabela 18).

Tabela 18 - Condições do pré-tratamento ultrassônico aplicado à biomassa mista e variáveis resposta

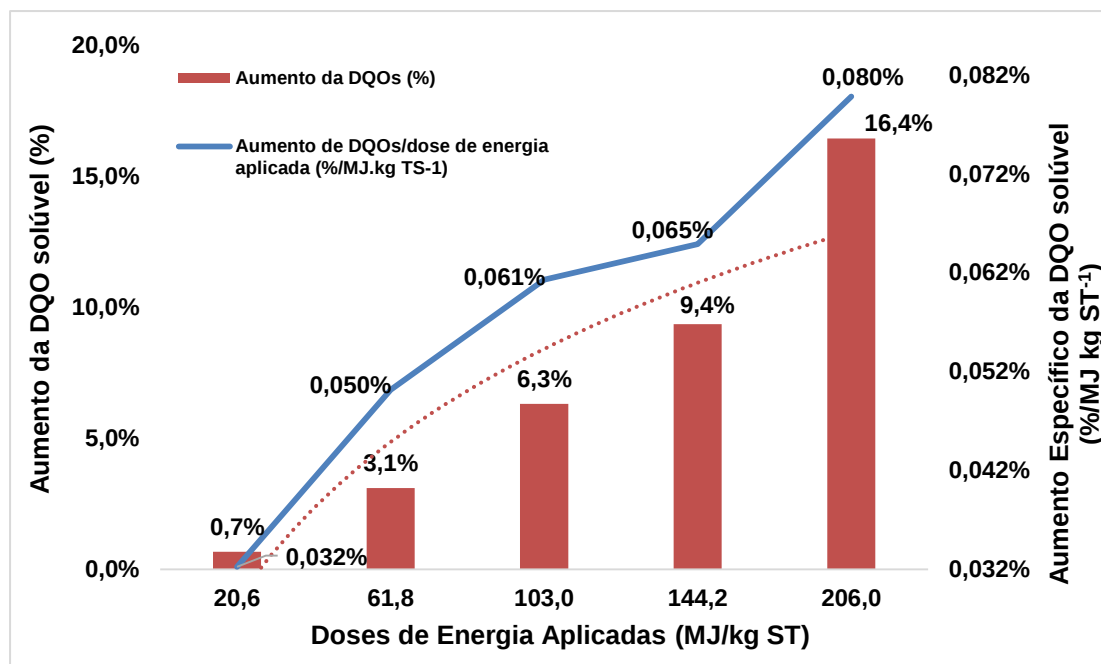
Amostra	Doses de Energia (MJ/kg ST)	Tempo de Exposição (min)	Temp. (°C)	DQO bruta (mg/L)	DQO solúvel (mg/L)	Relação DQOs/DQOb	Aumento de DQOs (%)	Aumento específico de DQOs (%/MJ.kg ST ⁻¹)
Controle	-	-		5652	602	0,1065	-	-
A1	20,6	1	80	5694	605	0,1063	0,5%	0,024%
A2	20,6	1	80	5712	606	0,1061	0,7%	0,032%
A3	20,6	1	80	5702	607	0,1065	0,8%	0,040%
A4	61,8	3	80	5797	619	0,1068	2,8%	0,046%
A5	61,8	3	80	5793	622	0,1074	3,3%	0,054%
A6	61,8	3	80	5788	621	0,1073	3,2%	0,051%
A7	103,0	5	80	5832	638	0,1094	6,0%	0,058%
A8	103,0	5	80	5840	641	0,1098	6,5%	0,063%
A9	103,0	5	80	5844	641	0,1097	6,5%	0,063%
A10	144,2	7	80	5884	659	0,1120	9,5%	0,066%
A11	144,2	7	80	5877	657	0,1118	9,1%	0,063%
A12	144,2	7	80	5880	659	0,1121	9,5%	0,066%
A13	206,0	10	80	5953	693	0,1164	15,1%	0,073%
A14	206,0	10	80	5972	703	0,1177	16,8%	0,081%
A15	206,0	10	80	5966	707	0,1185	17,4%	0,085%

Fonte: O Autor (2017).

A solubilização da biomassa aumentou de acordo com a significância da dose de energia aplicada, bem como com o tempo de exposição, em uma relação diretamente proporcional. As maiores doses de energia aplicadas ao longo dos maiores tempos de exposição acumularam os resultados mais favoráveis durante a etapa de otimização das condições do pré-tratamento via ultrassom (amostras A13, A14 e A15).

A condição padrão para fase preliminar aos ensaios anaeróbios foi determinada a partir do maior aumento percentual da DQO solúvel sobre a dose de energia aplicada (%/MJ.kgST⁻¹). Deste modo, o cenário final escolhido para o pré-tratamento foi composto pela dose de energia de 206 MJ/kg ST com tempo de exposição de 10 minutos, representado pelo aumento médio específico de DQO solúvel igual a 0,08%/MJ.kg ST⁻¹ (Figura 24).

Figura 24 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento via ultrassom



Fonte: O Autor (2017).

Tal qual o banho ultrassônico, o pré-tratamento da biomassa mista via micro-ondas de baixa frequência (90 Hz) e potência de 900 W aumentou a DQO bruta e solúvel da biomassa dentre todas as condições testadas. O acréscimo da concentração de DQO solúvel variou entre 4,3% e 44,9% com relação à biomassa *in natura* controle. Os maiores percentuais de aumento da DQO solúvel foram alcançados pela máxima dose energética aplicada sob o maior tempo de exposição, onde as concentrações variaram entre 868 e 874 mg O₂/L (Tabela 19).

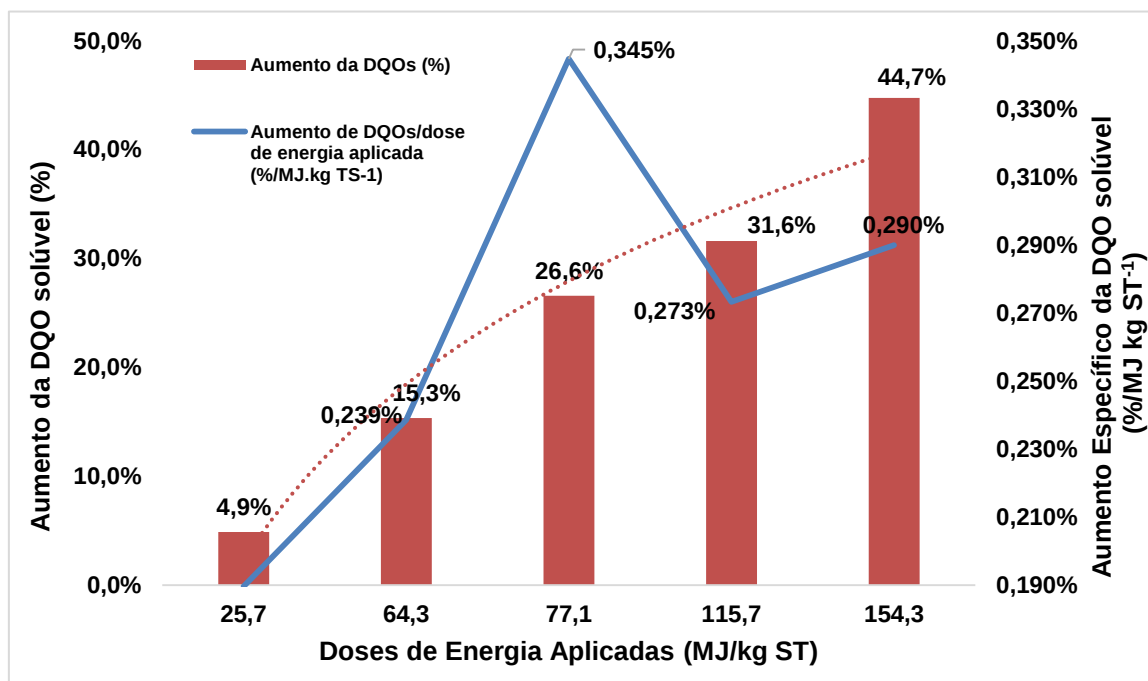
Embora os maiores percentuais de aumento da DQO solúvel tenham sido alcançados pelos ensaios B13, B14 e B15, a condição padrão selecionada para a fase de pré-tratamento via micro-ondas, foi composta pela dose de 77,1 MJ/kg ST e tempo de 30 segundos (B7, B8 e B9). Essa condição foi a que apresentou os resultados energeticamente mais favoráveis durante os testes, obtendo o maior aumento específico de DQO solúvel, da ordem de 0,345%/MJ.kg ST⁻¹ (Figura 25).

Tabela 19 - Condições do pré-tratamento de micro-ondas aplicado à biomassa mista e variáveis resposta

Amostra	Doses de Energia (MJ/kg ST)	Tempo de Exposição (seg)	DQO bruta (mg/L)	DQO solúvel (mg/L)	Relação DQOs/DQOb	Aumento de DQOs (%)	Aumento específico de DQOs (%/MJ.kg ST ⁻¹)
Controle	-	-	5652	602	0,1065	-	-
B1	25,7	10	5983	628	0,1050	4,3%	0,168%
B2	25,7	10	5986	632	0,1056	5,0%	0,194%
B3	25,7	10	5990	634	0,1058	5,3%	0,207%
B4	64,3	25	6201	692	0,1116	15,0%	0,233%
B5	64,3	25	6211	696	0,1121	15,6%	0,243%
B6	64,3	25	6208	695	0,1120	15,4%	0,240%
B7	77,1	30	6317	757	0,1198	25,7%	0,334%
B8	77,1	30	6322	763	0,1207	26,7%	0,347%
B9	77,1	30	6321	766	0,1212	27,2%	0,353%
B10	115,7	45	6482	788	0,1216	30,9%	0,267%
B11	115,7	45	6479	792	0,1222	31,6%	0,273%
B12	115,7	45	6486	797	0,1229	32,4%	0,280%
B13	154,3	60	6723	868	0,1291	44,2%	0,286%
B14	154,3	60	6730	874	0,1299	45,2%	0,293%
B15	154,3	60	6726	872	0,1296	44,9%	0,291%

Fonte: O Autor (2017).

Figura 25 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento via micro-ondas



Fonte: O Autor (2017).

Quanto aos resultados dos testes de otimização do pré-tratamento de autoclavagem, o melhor desempenho, em termos de aumento da DQO solúvel, foi alcançado pelos níveis positivo e negativo (temperatura de 120°C; tempo de 30 minutos), respectivamente, do planejamento fatorial multivariado empregado (Tabela 20 e Figura 26).

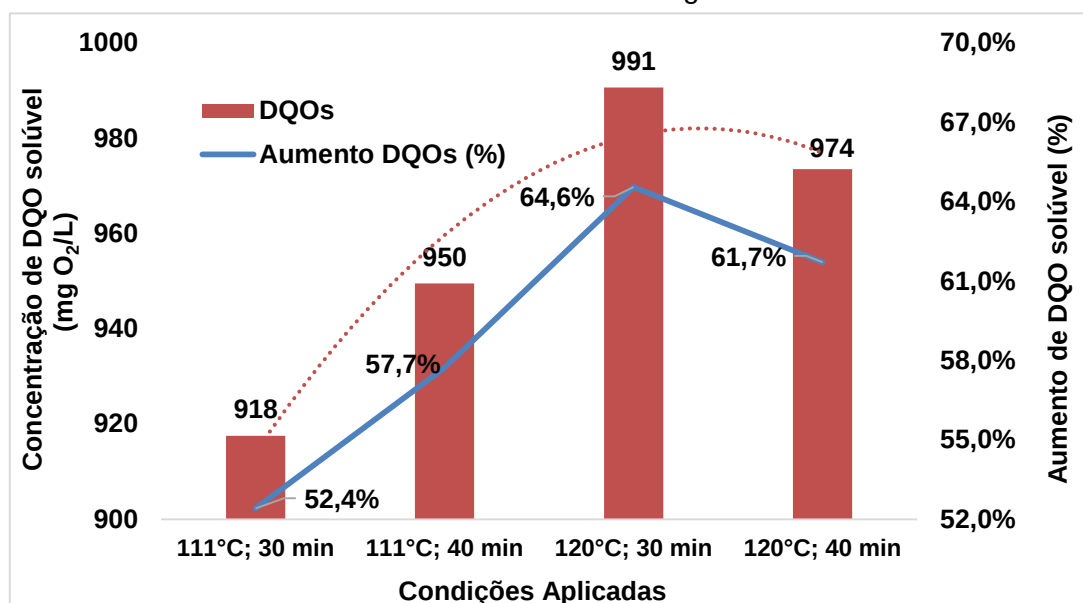
Tabela 20 - Planejamento fatorial 2² para seleção das condições do pré-tratamento térmico por autoclavagem de biomassa mista

Variável	Nível (-1)	Nível (+1)
Tempo	30 min	40 min
Temperatura	111°C	120°C

Ensaio	Níveis		Resposta (DQO solúvel)	
	Temperatura	Tempo	mg/L	Aumento (%)
1	-1	-1	913	51,7
2	-1	+1	952	58,1
3	+1	-1	997	65,7
4	+1	+1	971	61,3
1	-1	-1	922	53,2
2	-1	+1	947	57,3
3	+1	-1	984	63,5
4	+1	+1	976	62,1

Fonte: O Autor (2017).

Figura 26 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento de autoclavagem



Fonte: O Autor (2017).

As especificações finais dos pré-tratamentos de ultrassom, micro-ondas e autoclave para biomassa mista *in-natura* de microalgas e cianobactérias estão expressas na Tabela 21, visto que apresentaram as respostas mais favoráveis à solubilização do substrato estudado durante a fase de potencialização das condições de pré-tratamento.

Tabela 21 - Condições finais dos mecanismos de pré-tratamento para biomassa mista

Pré-tratamento	Condições
Ultrassom	206 MJ/kg ST; 10 min
Micro-ondas	77,1 MJ/kg ST; 30 seg
Autoclavagem	120°C; 30 min; 1 kgf/cm ²

Fonte: O Autor (2017).

5.2.2 Caracterização da biomassa mista e efeito dos pré-tratamentos

A partir da biomassa coletada no açude de Apipucos, foram identificadas cerca de 21 espécies diferentes de microalgas e cianobactérias, distribuídas em 3 classes: *Chlorophyceae* (11), *Cyanophyceae* (8), *Xanthophyceae* (2), conforme apresenta a Tabela 22.

Tabela 22 - Microalgas e cianobactérias identificadas no Açude de Apipucos

Classes	Espécies ¹
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pediastrum duplex</i> , <i>Pediastrum tetras</i> , <i>Echinosphaerella limnetica</i> , <i>Desmodesmus armatus</i> , <i>Prototheca mariforme</i> , <i>Tetradismus wisconsinensis</i> , <i>Gloeotila pelagica</i> , <i>Westella botryoides</i> , <i>Scenedesmus ecoris</i> , <i>Scenedesmus linearis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> .
<i>Cyanophyceae</i>	<i>Myxobaktron hirudiforme</i> , <i>Geitlerinema splendidum</i> , <i>Radiocystis fernandoi</i> , <i>Woronichinia fremyi</i> , <i>Aphanocapsa elachista</i> , <i>Planktothrix agardhii</i> , <i>Merismopedia tenuissima</i> , <i>Spirulina</i> sp.
<i>Xanthophyceae</i>	<i>Polyedriella crassispinata</i> , <i>Tetraplektron bourrellyi</i>

¹Bicudo (2005).

Fonte: O Autor (2017).

Embora a maior biodiversidade esteja representada por espécies de microalgas, as maiores densidades foram observadas para cianobactérias, cerca de $3,8 \times 10^8$ células/ml. O gênero *Planktothrix* também foi encontrado, sendo este gênero produtor de microcistina, cujas propriedades tóxicas em seres humanos incluem a ocorrência de doenças hepáticas, gastroenterite e câncer (AGOAS, 2008; BARBOSA, 2009). A dominância de cianobactérias no meio é, majoritariamente, consequência das condições de eutrofização do corpo hídrico (AZEVEDO, 1998; DOKULIL e TEUBNER, 2000, LEGNANI *et al.* 2005).

Tabela 23 - Caracterização da biomassa mista de microalgas e cianobactérias

Parâmetros	BMIN	BMUS	BMMO	BMAC
Sólidos Totais (ST)	7100 mg/L	7700 mg/L	7500 mg/L	7600 mg/L
Sólidos Voláteis (SV)	5900 mg/L	6620 mg/L	6600 mg/L	6400 mg/L
SV/ST	83%	86%	88%	84%
DQO bruta	5652 mg/L	5950 mg/L	6318 mg/L	6481 mg/L
DQO solúvel	603 mg/L	687 mg/L	755 mg/L	988 mg/L
DQOs/DQOb	10,6%	11,5%	11,9%	15,2%
Lipídios	4,1% ST	4,1% ST	4,1% ST	4,2% ST
Proteínas	34,2% ST	34,2% ST	37,3% ST	38,4% ST
Carboidratos	27,6% ST	27,7% ST	29,4% ST	29,6% ST
NTK	389 mg/L	422 mg/L	448 mg/L	467 mg/L
NH ₄ ⁺	24,2 mg/L	25,6 mg/L	27,2 mg/L	28,2 mg/L
pH	7,3± 0,01	7,6± 0,03	7,7± 0,03	7,7± 0,1
CE	1370 µS/cm	1463 µS/cm	1552 µS/cm	1568 µS/cm
SO ₄ ²⁻	2,8 mg/L	5,3 mg/L	5,9 mg/L	6,3 mg/L
PO ₄ ³⁻	9,8 mg/L	10,7 mg/L	10,5 mg/L	11,3 mg/L
Na ⁺ ,	24,2 mg/L	23,0 mg/L	23,3 mg/L	22,3 mg/L
K ⁺	20,2 mg/L	23,8 mg/L	25,8 mg/L	25,4 mg/L
Ca ²⁺	5,2 mg/L	4,7 mg/L	4,6 mg/L	4,4 mg/L

BMIN: Biomassa mista *in natura*; BMUS: Biomassa mista após ultrassom; BMMO: Biomassa mista após micro-ondas; BMAC: Biomassa mista após autoclavagem.

Fonte: O Autor (2017).

Foram observadas altas concentrações de sais na biomassa, conforme indicam os resultados de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e condutividade elétrica, que podem ser explicadas pelas condições do meio de floração das microalgas, influenciado sazonalmente pelas marés, pelo influxo de água do mar no reservatório e pela drenagem terrestre ocasionada pelas chuvas. A composição bioquímica da biomassa mista de microalgas e cianobactérias *in natura* e pós tratamentos para lise celular (Tabela 23).

Todos os pré-tratamentos resultaram em efeitos positivos sobre a biomassa mista no que se refere à solubilização do substrato *in natura*. O maior grau de solubilização foi alcançado pelo mecanismo de hidrólise térmica de alta pressão (HTAP) via autoclavagem, cerca de 41%. Resultados semelhantes foram obtidos por Cho *et al.* (2013), que registraram um aumento de 29% da solubilização ao tratar termicamente uma mistura de 70% *Chlorella* sp. e 30% *Scenedesmus* sp. a 120°C por 30 min. Além da alta solubilização da biomassa, houve também o aumento significativo de 64% da DQO solúvel após o tratamento hidrotérmico, em virtude da ruptura da parede celular e liberação de moléculas intracelulares à fase solúvel (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2012b; PASSOS e FERRER, 2014). Conforme mostra a Figura 27, houve uma redução na densidade de células e uma perceptível desfragmentação de material celular.

Figura 27 - Células de biomassa mista de microalgas e cianobactérias visualizadas em microscópio óptico (400x)

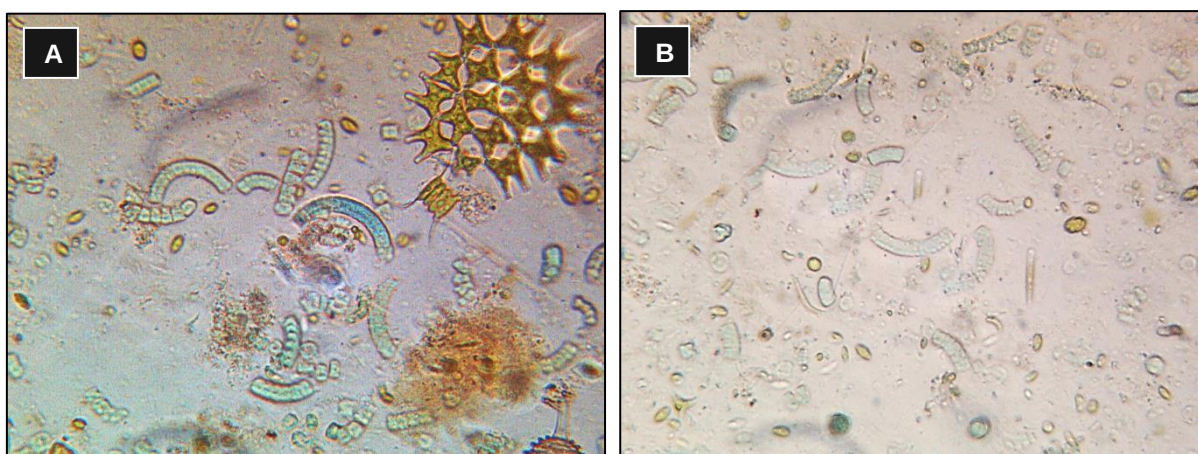


Figura 27A: Biomassa mista *in natura*; Figura 27B: Biomassa mista autoclavada.

Fonte: O Autor (2017).

Ainda, foram alcançados níveis de solubilização da ordem de 28,4% para a biomassa irradiada por micro-ondas, e de 15,5% para biomassa pré-tratada por ultrassom. Estes valores estão acima daqueles obtidos por estudos experimentais desenvolvidos por Passos *et al.* (2013), os quais conseguiram 3-8% de aumento da solubilização de uma biomassa mista de microalgas submetida a irradiação micro-ondas que variaram entre 21,8 e 65,4 MJ/kg ST. Por outro lado, Alzate *et al.* (2012) relataram um aumento de 32% na solubilização de uma suspensão mista de *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp. via ultrassom para uma dose energética de 57 MJ/kg ST. Apesar disso, a comparação dos efeitos dos pré-tratamentos de micro-ondas e ultrassom, quanto ao grau de solubilização e aumento da DQO solúvel, é impraticável; o desempenho dos mecanismos de desintegração ultrassônica e via micro-ondas é dependente de vários fatores, tais como concentração de ST, tipo de substrato, temperatura, densidade da dose, e tempo de exposição, e esse tipo de informação não é amplamente reproduzido na literatura (KHANAL *et al.* 2007).

O aumento em 25% da DQO solúvel da biomassa pré-tratada via micro-ondas é resultado da penetração uniforme de energia durante o processo de irradiação, o qual leva a água a um estado de fervura e promove a quebra de pontes de hidrogênio, provocando mudanças na estrutura de proteínas, pressão no sistema biológico e forçando compostos para fora da matriz biológica da célula. Já o aumento de quase 14% da DQO solúvel da biomassa sonicada, pode ser explicado pela formação de regiões com vapor líquido dentro das células, as quais são comprimidas e implodidas, produzindo calor, radicais livres, alta pressão, e então danos à parede celular.

No que diz respeito às relações C/N, estas foram da ordem de 15:1 para biomassa mista intacta, e de 14:1 para a biomassa submetida a pré-tratamentos, estando esses valores situados moderadamente abaixo da faixa ideal para digestão anaeróbia que varia entre 20:1 e 25:1 (YEN e BRUNE, 2007).

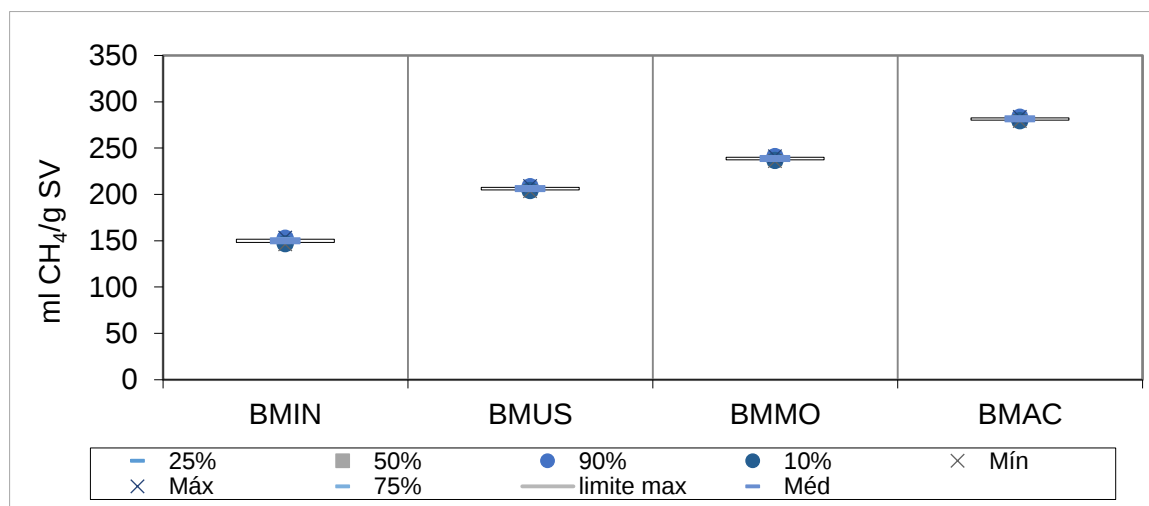
As concentrações de sulfato aumentaram após os pré-tratamentos aplicados, em consequência da solubilização de macromoléculas, alcançando um valor máximo 6,3 mg SO₄²⁻/L para biomassa submetida à hidrólise térmica de alta pressão. Mesmo

assim, sob nenhuma condição, esses teores se encontraram em níveis considerados inibitórios, ainda que parcialmente, à metanogênese. Assim sendo, as altas relações DQO/SO_4^{2-} favoreceram às bactérias metanogênicas, situando-se no intervalo de 1000:1 para biomassas submetidas a mecanismos de pré-hidrólise celular.

5.2.3 Produção de CH_4 e biodegradabilidade do substrato

As maiores produções de CH_4 com base nos sólidos voláteis foram alcançadas pelas biomassas sujeitas a mecanismos de pré-hidrólise, obtendo valores médios da ordem de 200 ml CH_4 /g SV, 238 ml CH_4 /g SV e 285 ml CH_4 /g SV para os pré-tratamentos de ultrassom, micro-ondas e autoclavagem, respectivamente (Figura 28). Tais rendimentos de CH_4 foram superiores em 31%, 56% e 87% nos reatores com biomassa pré-tratada por micro-ondas, nos reatores com biomassa ultra-sonicada, e nos reatores que receberam substrato pós autoclavagem, respectivamente, com relação à biomassa mista controle.

Figura 28 - Rendimento de CH_4 na digestão anaeróbia de biomassa mista de microalgas e cianobactérias *in natura* e pós tratamentos



BMIN: Reator com biomassa mista *in natura*; BMUS: Reator com biomassa mista irradiada por micro-ondas; BMMO: Reator com biomassa mista sonicada; BMAC: Reator com biomassa mista autoclavada.

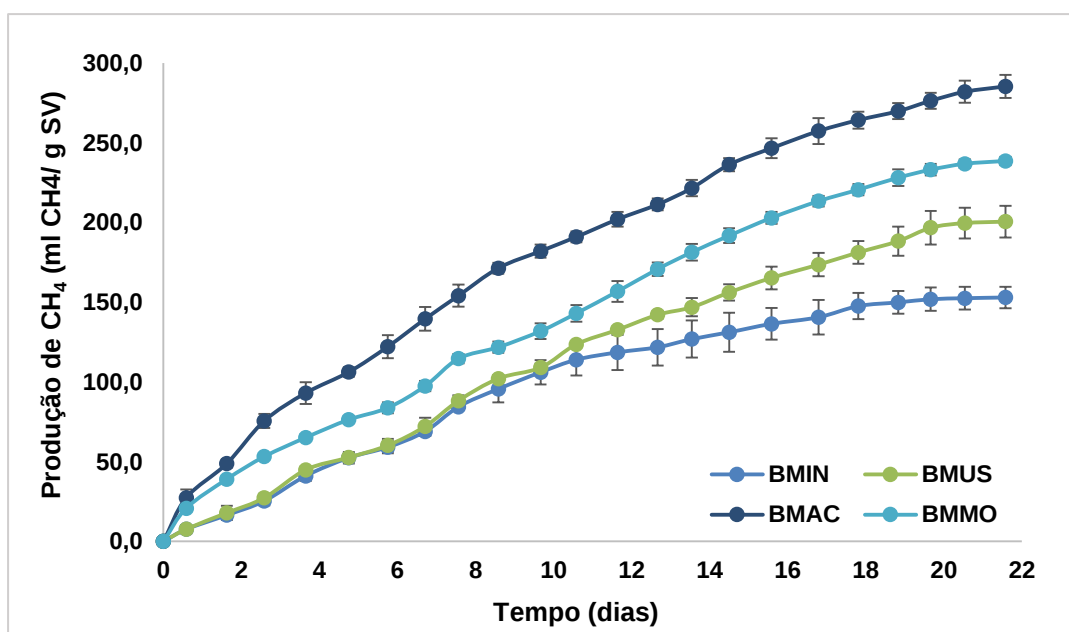
Fonte: O Autor (2017).

As produções reais médias de CH_4 /g SV compreenderam cerca de 42% do valor médio de 467 ml CH_4 /g SV obtido a partir do cálculo do rendimento teórico máximo de CH_4 que a degradação anaeróbia da biomassa mista poderia totalizar e

que leva em consideração a composição bioquímica do substrato em termos de lipídios, proteínas e carboidratos.

As curvas de produção acumulada de $\text{CH}_4/\text{g SV}$ estão apresentadas na Figura 29. Os rendimentos de metano com base nos sólidos voláteis de microalgas foram significativamente aumentados pela atuação dos pré-tratamentos quando comparados à biomassa controle não-tratada. O melhor desempenho foi obtido pela biomassa mista submetida à HTAP por autoclavagem, possivelmente, em decorrência da redução das macromoléculas a compostos com menor peso molecular, estando estes mais prontamente disponíveis para assimilação pelas bactérias anaeróbias.

Figura 29 - Produção acumulada de CH_4 na digestão anaeróbia de biomassa mista de microalgas e cianobactérias *in natura* e pós tratamentos (S/l: 0,5)



BMIN: Reator com biomassa mista *in natura*; BMUS: Reator com biomassa mista irradiada por micro-ondas; bMMO: Reator com biomassa mista sonicada; BMAC: Reator com biomassa mista autoclavada.

Fonte: O Autor (2017).

Além do mais, é possível notar que o processo de conversão da biomassa autoclavada a CH_4 não foi apenas superior, como também mais rápido, alcançando os 100 ml $\text{CH}_4/\text{g STV}$ aos 4 dias após o início da digestão. Esse resultado sugere que o metano foi produzido a uma taxa mais rápida que durante a digestão da biomassa *in natura*, a qual alcançou o volume 100 ml $\text{CH}_4/\text{g SV}$ depois de 9 dias de incubação. Embora a taxas mais lentas que aquela observada na digestão da biomassa

autoclavada, a conversão das biomassas irradiadas por micro-ondas e ultrassom a CH_4 aconteceu também mais rapidamente que aquela do substrato algal controle. Ainda, pode-se constatar que as taxas de degradação da biomassa mista não pré-tratada e da biomassa tratada por micro-ondas apresentaram comportamentos cinéticos similares, não diferindo-se entre si, quanto ao potencial metanogênico, durante a 1ª metade de todo o ciclo de digestão. É possível que não tenha havido mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do substrato ultrassonicado, e, por isso, os mecanismos atuantes na degradação anaeróbia dos substratos nas duas condições tenham se correspondido.

Essa variação na produção de CH_4 é relativa aos efeitos provocados pelos diferentes mecanismos de desintegração celular. Desta forma, esses mecanismos atuaram diferentemente na biomassa sob o princípio de redução do tamanho das partículas, aumentando a disponibilidade de área para a degradação microbiana, promovendo a liberação da DQO solúvel pela ruptura da parede celular, e aumentando a emulsificação de gorduras.

Mesmo com um significativo aumento no potencial de produção de CH_4 , o maior volume acumulado durante o ensaio (285 ml CH_4/g SV) foi inferior aos resultados obtidos por Alzate *et al.* (2012) e Cho *et al.* (2013), que também reportaram efeitos positivos a partir de pré-tratamento hidrotérmico no rendimento de CH_4 e na digestão anaeróbia de biomassa microalgal. Na fermentação de *Acutodesmus obliquus* e *Oocystis* sp., Alzate *et al.* (2012) alcançaram um aumento de 31% no rendimento de CH_4 (cerca de 300 ml CH_4/g SV) quando a biomassa foi previamente submetida a 140°C e 1,2 bar de pressão por 15 min. Da mesma forma, Cho *et al.* (2013) conseguiram um aumento de 20% na produção de CH_4 em reatores batelada, acumulando 336 ml CH_4/g SV na digestão de uma biomassa composta de 70% *Chlorella* sp. e 30% *Scenedesmus* sp. pré-tratada a 120°C por 30 min.

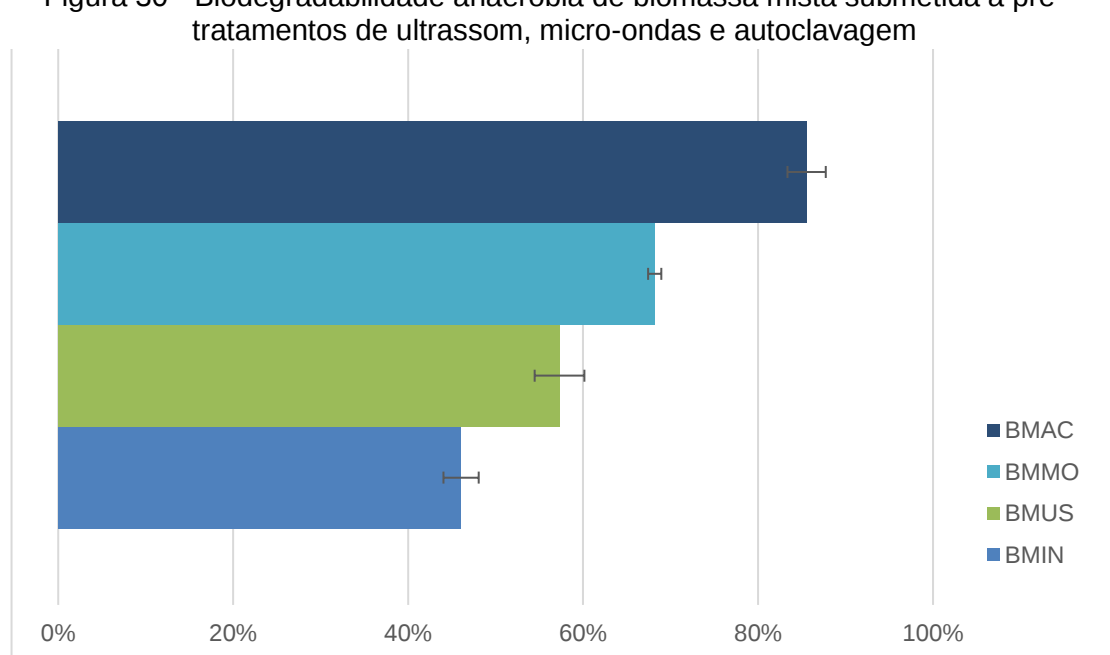
Para biomassa de *Acutodesmus obliquus* e *Oocystis* sp., pré-tratada por ultrassom com doses variáveis entre 10 e 57 MJ/kg ST, Alzate *et al.* (2012) aumentarem em 6-13% a produção de CH_4 . No entanto, na digestão anaeróbia de *Scenedesmus* sp., pré-tratada com doses ultrassônicas ainda mais altas (100-130

MJ/kg ST), González-Fernández *et al.* (2012a) potencializaram o rendimento de CH₄ em até 90%. Ainda assim, esses autores obtiveram valores inferiores ao volume de 200 ml CH₄/g SV alcançado pela fermentação da biomassa mista sonicada com 206 MJ/kg ST deste estudo.

Para irradiação por micro-ondas, Passos *et al.* (2013b) relataram um aumento de rendimento de 92 ml CH₄/g SV, acumulando 210 ml CH₄/g SV na digestão de uma biomassa mista de microalgas cultivada em um sistema aberto de tratamento de efluentes, pré-tratada com 65,4 MJ/kg ST de dose energética. Com uma dose de energia moderadamente superior (77,1 MJ/kg ST) àquela utilizada por Passos *et al.* (2013b), este estudo foi capaz de relatar um rendimento um pouco mais favorável na digestão da biomassa mista, cerca de 238 ml CH₄/g SV.

Assim como para os rendimentos de CH₄, todos os substratos pré-tratados alcançaram percentuais de biodegradabilidade superiores ao da biomassa *in natura*, com destaque para a biomassa autoclavada, com cerca de 83% (Figura 30). Embora a parcela biodegradável entre as biomassas sujeitas a pré-tratamentos tenha sido alta, da ordem de 69%, este valor indica que, mesmo assim, o processo foi incompleto, e sugere que o potencial metanogênico de microalgas e cianobactérias está, de fato, correlacionado a sua composição intra e extracelular.

Figura 30 - Biodegradabilidade anaeróbia de biomassa mista submetida a pré-tratamentos de ultrassom, micro-ondas e autoclavagem



BMIN: Reator com biomassa mista *in natura*; BMUS: Reator com biomassa mista irradiada por micro-ondas; BMMO: Reator com biomassa mista pós ultrassom; BMAC: Reator com biomassa mista autoclavada.

Fonte: O Autor (2017).

Os baixos rendimentos de CH_4 e as altas frações biodegradáveis obtidas a partir da digestão da biomassa mista podem ser explicados com base na variedade de espécies de microalgas e cianobactérias presentes em sua composição. O potencial de produção de metano depende da composição macromolecular das espécies utilizadas; quanto maior o teor de lipídios dentre as macromoléculas, teoricamente, maior é a produção de CH_4 . O potencial máximo de produção a partir da biomassa está muito mais relacionado à riqueza de compostos intracelulares, que à biodegradabilidade da parede celular propriamente dita. Neste caso, os rendimentos de CH_4 foram baixos, quando comparados a resultados obtidos na literatura, porque o substrato utilizado é, majoritariamente, composto de microalgas e cianobactérias que apresentam limitadas concentrações de constituintes com potencial real de conversão a CH_4 . As altas taxas de digestibilidade, alcançadas a partir dos mecanismos de pré-tratamento, podem ser explicadas a partir da composição da parede celular. Microalgas e cianobactérias facilmente biodegradáveis não apresentam parede celular ou esta é à base de proteínas sem celulose ou hemicelulose, como é o caso de *Spirulina* sp., espécie encontrada em altas densidades no substrato misto nesse estudo e submetido à digestão. Espécies microalgais podem dispor de parede celular

de fácil degradação, porém o conteúdo intracelular pode ser pouco produtivo, do ponto de vista energético.

No que se refere às parcelas que não foram digeridas, estudos conduzidos por Derenne *et al.* (1992) revelam que a classe *Chlorophyceae* pode sintetizar, em sua parede celular, certos biopolímeros de difícil desintegração, como esporopolenina e algeanans. Sendo estes últimos biopolímeros alifáticos insolúveis e não hidrolisáveis, extremamente resistentes à degradação química e enzimática. Desta maneira, células de algumas espécies de algas verdes, empregadas no ensaio, podem, por ventura, ainda ser encontradas intactas dentro dos reatores ao fim do período de incubação.

5.2.4 Efluente da digestão

A digestão anaeróbia da biomassa mista resultou num aumento de 12 a 15 vezes das concentrações de NH_4^+ e de 5 a 7 vezes de PO_4^{3-} dentre todos os ensaios realizados (Tabela 24). Para NH_4^+ , as concentrações finais variaram entre 372 e 391 mg NH_4^+/L , e para PO_4^{3-} mantiveram-se na faixa de 74-79 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$, com destaque para a biomassa irradiada por ultrassom. A alta solubilização de N foi acompanhada pela produção de CH_4 , sugerindo que os mecanismos de pré-tratamento influenciaram positivamente sobre o aumento dessas concentrações mediante degradação anaeróbia.

Embora estudos de comparação sejam escassos, no que se refere à recuperação de nutrientes, Keymer *et al.* (2013) observaram que a solubilização de N foi de 2,5% para biomassa bruta de *Scenedesmus* sp. para 43% quando submetida a pré-tratamento térmico seguido de digestão anaeróbia. O aumento da mineralização do N (4-7%) esteve fortemente correlacionado com o aumento do potencial bioquímico de CH_4 do substrato (Tabela 24). Desta forma, os resultados confirmam o potencial de digestão anaeróbia, não apenas da produção de CH_4 , mas também para recuperação de nutrientes. A relação N:P média de 6:1 do sobrenadante apresenta relativo potencial para o cultivo de microalgas uma vez que se apresenta próxima à faixa ideal de 10 – 17:1 (DE SCHAMPHELAIRE e VERSTRAETE, 2009).

Tabela 24 - Caracterização do efluente da digestão de biomassa mista

Parâmetros	BMIN	BMUS	BMMO	BMAC
pH	7,1 ± 0,1	7,2 ± 0,09	6,8 ± 0,05	6,9 ± 0,1
Potencial Redox	-259 mV	-306 mV	-322 mV	-321 mV
DQO solúvel	251,5 mg/L	299,4 mg/L	278,9 mg/L	328,9 mg/L
AGV	24,2 mg/L	21,7 mg/L	12,9 mg/L	17,2 mg/L
Alcalinidade	1540 mg/L	1587 mg/L	1548 mg/L	1545 mg/L
AGV/ALC	0,016	0,014	0,008	0,011
NTK	403,9 mg/L	440,7 mg/L	487,5 mg/L	501,2 mg/L
NH ₄ ⁺	383,0 mg/L	390,7 mg/L	373,5 mg/L	371,5 mg/L
PO ₄ ³⁻	75,8 mg/L	79,2 mg/L	76,2 mg/L	74,4 mg/L
SO ₄ ²⁻	10,7 mg/L	11,1 mg/L	8,4 mg/L	4,5 mg/L

BMIN: Biomassa mista *in natura*; BMUS: Biomassa mista após ultrassom; BMMO: Biomassa mista após micro-ondas; BMAC: Biomassa mista após autoclavagem.

Fonte: O Autor (2017).

Os altos teores de NH₄⁺ estão relacionados à degradação de substrato rico em proteínas (34-38% da biomassa seca) e à queda do potencial de oxirredução, levando à formação de ácidos (H⁺). Estando o meio reduzido (ΔG negativo), as reações de conversão de nitrogênio orgânico à amônia solúvel são favorecidas cinética e termodinamicamente.

As maiores remoções de DQO solúvel foram observadas para os reatores BMAC e BMMO, 67% e 63%, respectivamente, estando diretamente relacionadas ao potencial de produção de CH₄. Quanto à estabilidade dos reatores anaeróbios, esta foi avaliada a partir do indicador AGV/Alcalinidade. Todos os reatores apresentaram valores inferiores a 0,2, indicando que a conversão de ácidos orgânicos a CH₄ pelas metanogênicas se dava quase que na mesma proporção em que esses ácidos eram metabolizados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO 3

Nesta seção, são discutidos, em detalhes, os resultados do experimento 3.

5.3.1 Otimização do pré-tratamento hidrotérmico

Os ensaios prévios de hidrólise térmica via autoclavagem tiveram como objetivo selecionar o tempo de exposição e a temperatura adequados que promovessem a hidrólise da parede celular de *Chlorella* sp. aumentando a concentração de DQO solúvel. Na Tabela 25, encontram-se os níveis de trabalho e as respostas, em termos de aumento percentual de DQO solúvel (mg O₂/L) do planejamento fatorial multivariado empregado.

Tabela 25 - Planejamento fatorial 2² para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem de biomassa comercial de *Chlorella* sp.

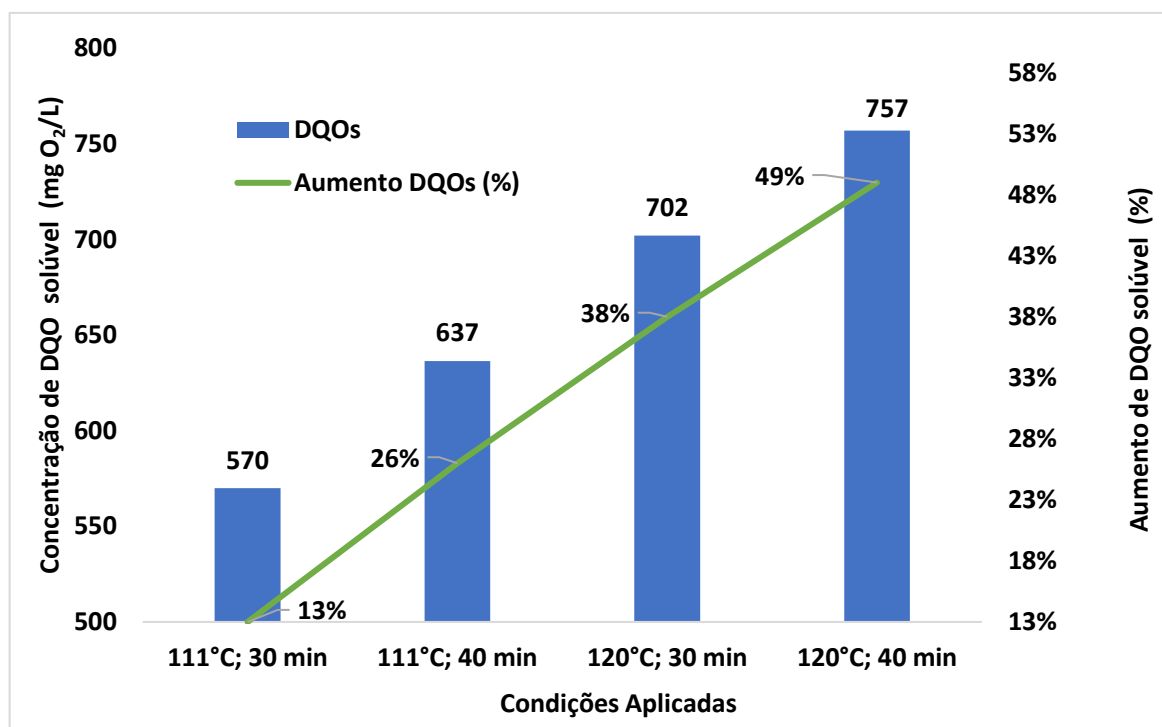
Variável	Nível (-1)		Nível (+1)	
Tempo	30 min		40 min	
Temperatura	111°C		120°C	
Ensaio	Níveis		Resposta (DQO solúvel)	
	Tempo	Temperatura	mg O ₂ /L	Aumento (%)
1	-1	-1	572	14
2	-1	+1	633	25
3	+1	-1	697	37
4	+1	+1	753	48
1	-1	-1	568	12
2	-1	+1	640	26
3	+1	-1	707	39
4	+1	+1	761	50

Fonte: O Autor (2017).

Diante das condições estudadas, foi possível concluir que o melhor desempenho referente ao aumento da solubilização da matéria orgânica foi observado para os dois níveis positivos do planejamento, tempo de 40 minutos e temperatura de 120°C, representando um aumento médio da DQO solúvel da ordem de 49%. Dessa

maneira, tais condições foram pré-selecionadas para estruturação do pré-tratamento preliminar ao ensaio de biodegradabilidade (Figura 31).

Figura 31 - DQO solúvel como variável resposta dos testes de otimização do pré-tratamento de autoclavagem



Fonte: O Autor (2017).

5.3.2 Caracterização da biomassa comercial de *Chlorella* sp. e efeito do pré-tratamento hidrotérmico

Com o objetivo de hidrolisar macromoléculas, romper a parede celular e aumentar a disponibilidade de material orgânico ao consórcio bacteriano para degradação e conversão a CH₄, o pré-tratamento de hidrólise térmica de alta pressão (HTAP) via autoclavagem foi aplicado à biomassa de *Chlorella* sp. Além do aumento significativo de 48% da DQO solúvel na suspensão de microalgas após autoclavagem, foram observados também aumentos nas concentrações de NH₄⁺. Esses resultados são explicados a partir do fenômeno de aplicação de calor e pressão ao sistema, o qual promove a solubilização de frações orgânicas particuladas e, parcialmente, de complexos celulósicos.

Ademais, houve um aumento do teor de sólidos voláteis (SV) da biomassa autoclavada em relação à biomassa *in-natura* (Tabela 26); justifica-se assim o alto grau de solubilização, da ordem de 47%, obtido pela suspensão de *Chlorella* sp. Esse valor está em concordância com o que foi evidenciado por MENDEZ *et al.* (2014), que investigaram digestão anaeróbia de *C. vulgaris* seguida de pré-tratamento hidrotérmico (120°C, 40 min), e alcançaram 54% de solubilização da biomassa. De forma similar, Alzate e colaboradores (2012) relatam um aumento de 39% na solubilização da biomassa de *Microspora* sp. a 140°C por 15 min e pressão de 1,2 bar.

Tabela 26 - Caracterização da suspensão de biomassa comercial de *Chlorella* sp. *in-natura* e pré-tratada

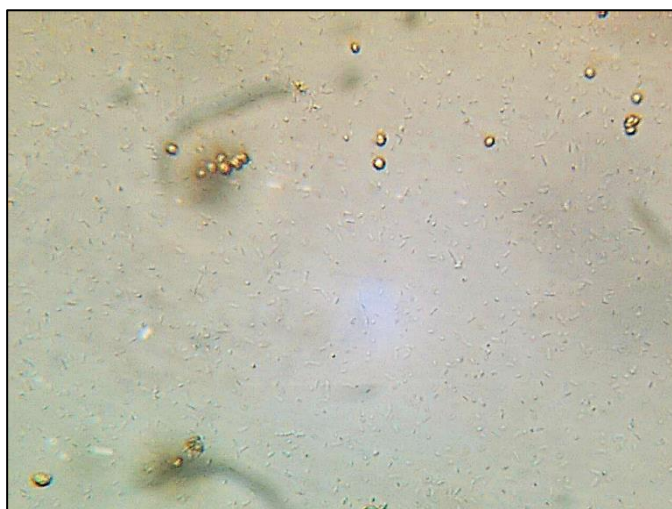
Parâmetros	Biomassa <i>in natura</i>		Biomassa pré-tratada	
	sem nutrientes	com nutrientes	sem nutrientes	com nutrientes
	INSN	INCN	PTSN	PTCN
Sólidos Totais (ST)	2586 mg/L	2586 mg/L	2712 mg/L	2712 mg/L
Sólidos Voláteis (SV)	2414 mg/L	2414 mg/L	2512 mg/L	2512 mg/L
pH	6,4 ± 0,2	6,1 ± 0,08	6,2 ± 0,1	6,1 ± 0,1
DQO bruta	5921 mg/L	6498 mg/L	6312 mg/L	7245 mg/L
DQO solúvel	507 mg/L	608 mg/L	752 mg/L	902 mg/L
NTK	37,8 mg/L	46,2 mg/L	37,9 mg/L	46,4 mg/L
NH ₄ ⁺	8,6 mg/L	16,5 mg/L	9,1 mg/L	17,2 mg/L
SO ₄ ⁻²	12,6 mg/L	21,2 mg/L	13,4 mg/L	22,1 mg/L
CE	158 µS/cm	428 µS/cm	273 µS/cm	503 µS/cm
Na ⁺	16,5 mg/L	28,38 mg/L	17,9 mg/L	29,8 mg/L
K ⁺	14,9 mg/L	27,16 mg/L	14,7 mg/L	26,9 mg/L
Ca ²⁺	4,1 mg/L	6,6 mg/L	4,3 mg/L	6,8 mg/L

Fonte: O Autor (2017).

Naturalmente, os reatores com biomassa de *Chlorella* sp. *in natura* e pré tratada que foram suplementados com nutrientes apresentaram concentrações de DQO solúvel superiores aos seus respectivos ensaios sem nutrientes, da ordem média de 608 mg O₂/L e 902 mg O₂/L, respectivamente. Pelo mesmo motivo, houve um aumento médio de mais de 100% das concentrações de NH₄⁺ nas versões dos reatores que

receberam suplementação. No entanto, essas concentrações mantiveram-se num intervalo abaixo de 18 mg NH_4^+/L , não representando assim, níveis de efeitos inibidores à produção de CH_4 . NH_4^+ tem efeito inibidor às bactérias metanogênicas quando presente em concentrações superiores a 3000 mg NH_4^+/L , inibindo a enzima sintetizadora de CH_4 e difundindo-se passivamente nas células das metanogênicas provocando desequilíbrio de prótons e deficiência de potássio (PARKIN *et al.* 1986).

Figura 32 - Células de *Chlorella* sp. visualizadas em microscópio óptico (400x)



Fonte: O Autor (2017).

As relações C:N observadas no início do experimento variaram entre 13:1 para os reatores com substrato *in-natura* (INSN e INCN), e 19:1 nos reatores com substrato pré-tratado (PTSN e PTCN), respectivamente. Desta forma, os reatores INSN e INCN encontraram-se moderadamente abaixo da faixa ideal (20-30:1, PARKIN *et al.* 1986) para digestão anaeróbia, enquanto que os reatores PTSN e PTCN mantiveram-se dentro desse intervalo.

Embora tenha ocorrido um aumento significativo de 73% da CE entre as suspensões de *Chlorella* sp., é possível observar que, tanto para os ensaios com algas *in-natura* como fonte de substrato, quanto para os ensaios com algas submetidas à HTAP, as concentrações de sais estiveram sustentadas em níveis considerados não-inibitórios. Uma grande preocupação durante processos de digestão de microalgas, são os efeitos das concentrações de sais sobre as bactérias metanogênicas. A salinidade causa a desidratação das células bacterianas devido ao aumento da pressão osmótica (CHENG *et al.*, 2008), mas isso pode variar de acordo com o

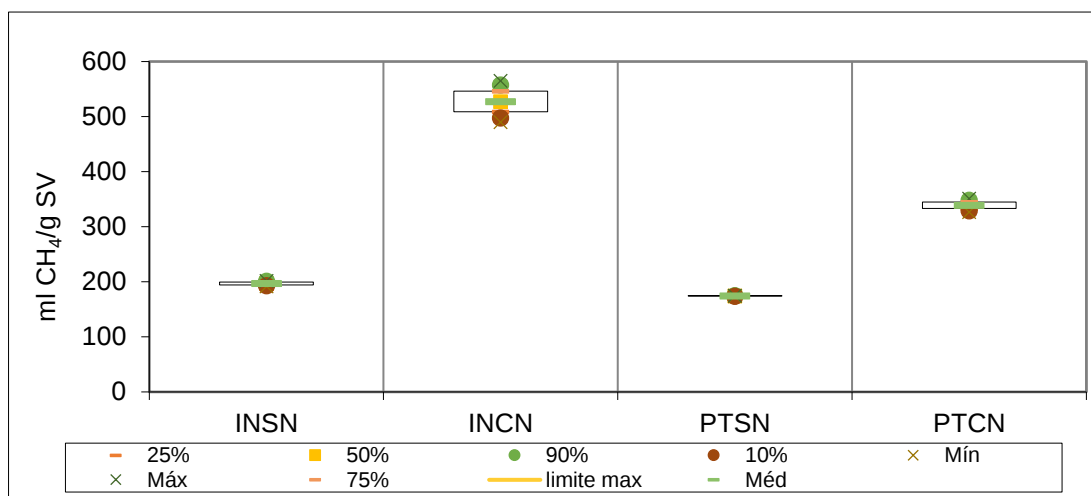
ambiente associado. Os valores das concentrações de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} em todas condições do estudo encontraram-se no intervalo considerado estimulante ao consórcio anaeróbio, e tendo efeitos positivos sobre a sinergia com outros íons.

As relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{-2}$ observadas no início do experimento mantiveram-se na faixa média de 44:1 para os ensaios com substrato de microalgas de células íntegras, e de 61:1 para os ensaios com biomassa autoclavada. Diante dessas proporções, a fermentação pelas bactérias metanogênicas é favorecida, uma vez que a extrema competição com as BRS, acontece em relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{-2}$ no intervalo 1,7-2,7. As baixas concentrações de SO_4^{-2} têm efeito positivo sobre a metanogênese, participando de um grande número de enzimas vitais quando inferior a 150 mg SO_4^{-2} /L (BITTON, 1994; METCALF e EDDY, 2006).

5.3.3 Produção de Metano e Biodegradabilidade

A descontinuidade da produção de CH_4 ocorreu aos 33 dias de tempo de incubação, permitindo concluir que o maior rendimento de CH_4 , dentre as 4 condições estudadas, foi alcançada pelos reatores inoculados com biomassa *in-natura* de *Chlorella sp.*, que receberam a suplementação por nutrientes (INCN). Por outro lado, o menor potencial metanogênico foi observado a partir da digestão da biomassa pré-tratada sem adição de nutrientes (PTSN). O reator INCN apresentou um rendimento médio da ordem de 537 ml CH_4 /g SV enquanto que os reatores PTCN, INSN e PTSN acumularam 353 ml CH_4 /g SV, 208 ml CH_4 /g SV e 178 ml CH_4 /g SV, respectivamente (Figura 33).

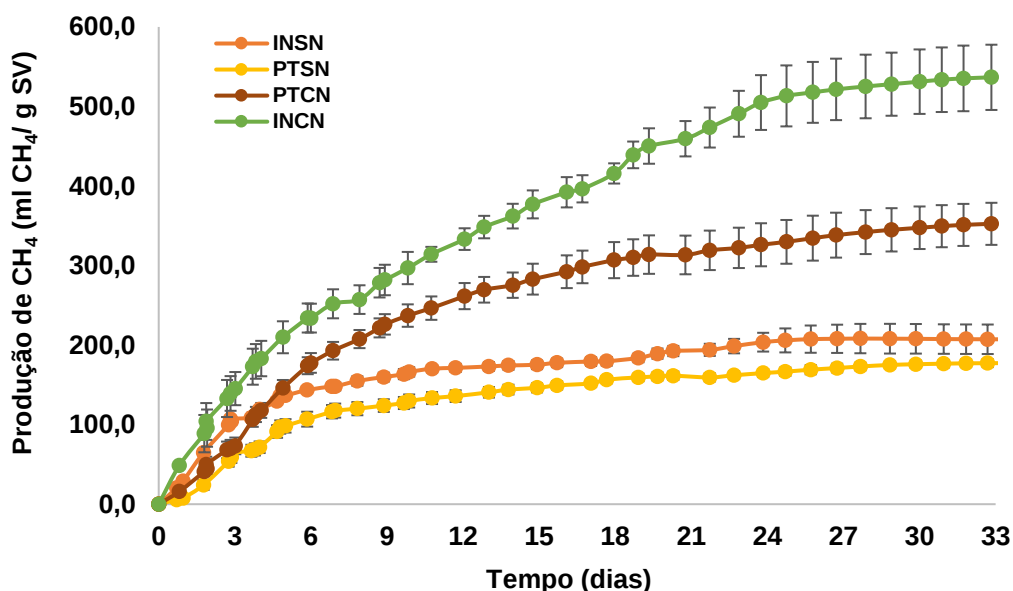
Figura 33 - Rendimento de CH_4 na digestão anaeróbia de biomassa comercial *Chlorella* sp.



INSN (alga *in-natura* digerida sem adição de nutrientes); INCN (alga *in-natura* digerida com adição de nutrientes); PTSN (alga pré-tratada digerida sem adição de nutrientes); PTCN (alga pré-tratada digerida com adição de nutrientes).

Fonte: O Autor (2017).

Figura 34 - Produção acumulada de CH_4 na digestão anaeróbia de biomassa comercial de *Chlorella* sp. (S/l: 0.5)



INSN (alga *in-natura* digerida sem adição de nutrientes); INCN (alga *in-natura* digerida com adição de nutrientes); PTSN (alga pré-tratada digerida sem adição de nutrientes); PTCN (alga pré-tratada digerida com adição de nutrientes).

Fonte: O Autor (2017).

Embora as maiores produções de CH_4 fossem esperadas nos ensaios que receberam os substratos de microalgas pré-tratadas, os reatores com biomassa *in*

natura apresentaram resultados mais favoráveis. Entretanto, no confrontamento das produções entre os reatores que não receberam suplementação nutricional (INSN e PTSN), indicando que não houveram diferenças significativas em seus respectivos rendimentos.

A produção de CH₄ no reator com biomassa *in natura* com nutrientes (INCN) não foi apenas superior as demais, como também mais rápida (Figura 34). Esta condição permitiu que a produção total de 200 ml CH₄/g SV acumulada pelo reator INSN aos 30 dias, fosse alcançada pelo reator INCN entre o 3º e 4º dia de tempo de incubação. Por outro lado, para todos os cenários estudados, a fase lag foi praticamente inexistente em decorrência da baixa relação S/I de 0,5 g DQO/g SSV, a qual evita a acumulação de ácidos orgânicos e potencializa a produção de biogás. A taxa de produção diária de CH₄ nos reatores INCN e PTCN foram da ordem média de 16 ml CH₄/g SV.dia e 11 ml CH₄/g SV.dia, respectivamente. Enquanto que para os reatores PTSN e PTCN esse valor esteve em torno dos 6 ml CH₄/g SV.dia.

A justificativa para o fato de que os reatores com biomassa autoclavada não se destacaram em relação aos com biomassa *in natura*, no que se refere ao potencial de produção de CH₄, é a procedência da biomassa microalgal. Para fins comerciais, o processo de sedimentação e recuperação da biomassa de microalgas envolve uma série de operações unitárias, como a floculação (UDUMAN *et al.* 2010). Durante esse processo, agentes floculantes são adicionados ao meio aquoso contendo a suspensão de microalgas com o objetivo de formar agregados de grandes dimensões. Agentes floculantes são ricos em sais metálicos, como o cloreto de alumínio (AlCl₃) e o sulfato de alumínio Al₂(SO₄), os quais podem provocar a lise da célula microalgal, conforme reportado por Papazi *et al.* (2010). O problema está na alta eficiência desses sais que são extremamente eletronegativos e apresentam alta velocidade de coagulação. A rápida agregação da biomassa de microalgas provoca um choque entre as células e a desestabilização da membrana, levando à sua ruptura. A partir da adição de uma dose mínima igual a 0,75 g/L de AlCl₃ e Al₂(SO₄), os autores relataram que 25% e 10% do total de células de *Chlorella minutissima* sofreram lise celular durante a técnica de coagulação. Desta forma, sugere-se que o rompimento das células da biomassa comercial de *Chlorella* sp. teria acontecido ainda em campo durante o processo de

colheita da biomassa em escopo comercial, e não, necessariamente, durante a realização do mecanismo de hidrólise térmica em laboratório.

No que se refere aos ensaios suplementados com nutrientes (INCN e PTCN), estes apresentaram, dentre todos os ensaios, os rendimentos de CH_4 mais significativos. A explicação para esses resultados pode estar relacionada aos efeitos dos micronutrientes sobre o consórcio anaeróbio no processo de digestão. Uma vez que a biomassa de microalgas já apresenta rica composição macromolecular, sobretudo, em carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, a adição extra de macroelementos pode não ter, neste caso, grande relevância sobre a cinética de degradação anaeróbia. Por outro lado, os microelementos podem ter exercido efeitos significativos como aditivos no processo de digestão. Dentre os elementos traços adicionados a partir de solução nutritiva (FLORENCIO, 1993), o cloreto de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) apresenta efeito estimulante na produção de CH_4 mediante à redução da toxicidade por amônia e sulfureto, enquanto que o cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) constitui proteínas corrinoídes que podem auxiliar na metanogênese a partir de compostos metil, além de ser indispensável para estabilidade da digestão, bem como para destravar uma possível acumulação de AGV, assim como o Níquel e o cloreto férrico ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Este último também constitui importantes enzimas que promovem a degradação da matéria orgânica. A limitada disponibilidade de Ni, Fe e CO afeta a estabilidade do processo de digestão anaeróbia e a produção de CH_4 , bem como pode inibir a atividade microbiana.

O déficit de produção de biogás do reator PTCN em relação ao reator INCN foi investigado a partir da hipótese de que durante o processo de autoclavagem, substâncias recalcitrantes ou tóxicas ao metabolismo metanogênico acabaram sendo geradas devido à elevada temperatura e pressão, sendo assim inibidoras ao processo de biometanização (WILSON e NOVAK; 2009; STRONG e GAPES, 2012; JARD *et al.* 2013). Subprodutos típicos presentes em hidrolisados de biomassa lignocelulósica, como o hidroximetilfurfural (HMF) inibem processos biológicos como a fermentação alcoólica e a metanogênese. Os resultados obtidos a partir da análise de cromatografia indicaram que tal composto tóxico não foi identificado na biomassa autoclavada. Desta forma, testes adicionais de caracterização da biomassa devem

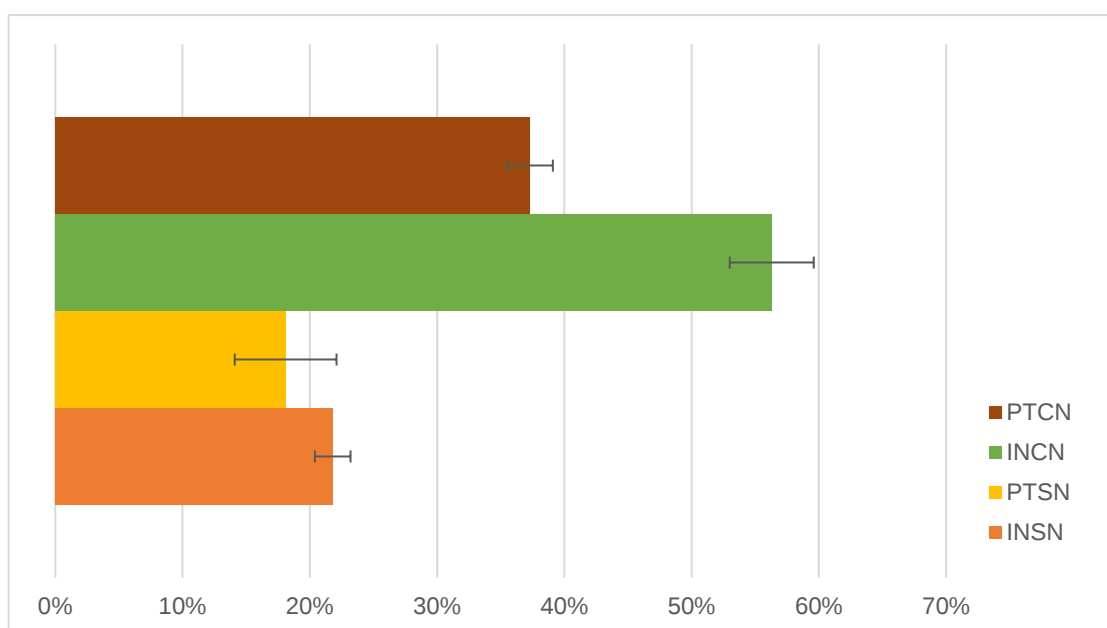
ser realizados, a fim de investigar se outros compostos tóxicos, como fenois ou produtos secundários não identificados, foram potencialmente formados durante HTAP atuando como dificultadores ou inibidores parciais do processo de biometanização.

Os rendimentos de CH₄ em todos os ensaios apresentaram-se em concordância com estudos anteriores que também investigaram o potencial de fermentação de diversas espécies de *Chlorella* sp. Lu *et al.* (2013) alcançaram um rendimento máximo de 403 ml CH₄/g SV na digestão de *Chlorella vulgaris* utilizando técnicas de bioaugmentação, diversificando a flora bacteriana e aumentando a eficiência de fermentação. Por outro lado, Ras *et al.* (2013) e Polakovicova *et al.* (2012), relataram produções de 240 ml CH₄/g SV e 189 ml CH₄/g SV, respectivamente, investigando também o potencial de biometanização a partir da digestão de *Chlorella vulgaris*, utilizando processos integrados de produção e digestão de microalgas em escala experimental. No tratamento biológico de *C. vulgaris* com protease (50°C, 2h) seguido de tratamento térmico a 75°C por 15 min, Mahdy e colaboradores (2014) reportaram um aumento de 57% na produção de CH₄, sendo esta igual a 300 ml de CH₄/g DQO. No entanto, nenhum desses estudos investigou a influência da adição extra de nutrientes sobre o potencial de geração de metano.

Em comparação com o potencial de produção de CH₄ obtido a partir da digestão da biomassa *in natura* de *Chlorella vulgaris* do Experimento 1, o rendimento de CH₄ de 208 ml CH₄/g SV da biomassa comercial foi inferior em 23% à produção alcançada pela fermentação da biomassa fresca de *C. vulgaris* (255 ml CH₄/g SV). Seguramente, a biomassa cultivada em laboratório ofereceu uma composição bioquímica mais interessante à conversão em metano. Quanto à biomassa comercial de *Chlorella* sp., as condições de crescimento, a composição do meio de cultura, bem como a frequência de suplementação do ecossistema podem ter influenciado nas características físicas, químicas e biológicas da microalga. No entanto, tais informações sobre as condições de cultivo, beneficiamento e recuperação dessa biomassa são desconhecidas.

Os percentuais de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa de *Chlorella sp.* nos experimentos testados estão apresentados na Figura 35. Quase 2/3 da biomassa *in-natura*, utilizada como substrato no reator INCN, foi convertida a metano, onde a microflora anaeróbia foi favorecida pela suplementação nutricional. A digestão dessa biomassa foi quase 3 vezes superior àquela observada no reator com biomassa autoclavada e sem adição de nutrientes (PTSN), e este, por sua vez, apresentou 50% da parcela de degradação biológica observada no reator com biomassa pré-tratada que foi incorporado com macro e microelementos (PTCN). Deste modo, é possível concluir que existiu uma correlação linear a digestibilidade anaeróbia do substrato algal e o meio suplementado, estando em concordância com os potenciais de produção de CH₄ evidenciados nos ensaios.

Figura 35 - Biodegradabilidade anaeróbia da biomassa comercial de *Chlorella sp.*



INSN (alga *in-natura* digerida sem adição de nutrientes); INCN (alga *in-natura* digerida com adição de nutrientes); PTSN (alga pré-tratada digerida sem adição de nutrientes); PTCN (alga pré-tratada digerida com adição de nutrientes).

Fonte: O Autor (2017).

5.3.4 Efluente da Digestão

As concentrações de NH_4^+ no efluente da digestão foram superiores às concentrações observadas no início do experimento. As maiores concentrações de NH_4^+ foram relatadas nos ensaios PTCN e INCN, com teores de 230 mg NH_4^+ /L e 265 mg NH_4^+ /L, respectivamente. Chen *et al.* (2008) argumentam que NH_4^+ é produzido a partir da decomposição biológica de matéria nitrogenada, principalmente sob a forma de proteínas. Deste modo, os reatores que apresentaram maiores percentuais de biodegradabilidade da biomassa e de produção de CH_4 naturalmente apresentaram maiores concentrações de NH_4^+ no sobrenadante da digestão, visto que a microflora anaeróbia atuou mais ativamente nas reações de síntese e produção de metabólitos. Ademais, o meio reduzido favoreceu a solubilização do nitrogênio orgânico em NH_4^+ . SIALVE *et al.* (2009) destacam que, quanto maior a concentração de proteínas na composição bioquímica da espécie digerida, maior será a liberação de amônia no meio aquoso (Tabela 27).

Tabela 27 - Caracterização do efluente da digestão de biomassa comercial de *Chlorella* sp.

Parâmetros	Biomassa <i>in natura</i>		Biomassa pré-tratada	
	sem nutrientes	com nutrientes	sem nutrientes	com nutrientes
	INSN	INCN	PTSN	PTCN
pH	6,9 ± 0,2	7,4 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,4 ± 0,1
Potencial Redox	-245 mV	-232 mV	-321 mV	-307 mV
DQO solúvel	175 mg/L	153 mg/L	163 mg/L	133 mg/L
NTK	192,9 mg/L	270,2 mg/L	150,1 mg/L	301,8 mg/L
NH_4^+	161,6 mg/L	229,2 mg/L	128,3 mg/L	264,8 mg/L
SO_4^{-2}	7,5 mg/L	22,0 mg/L	16,2 mg/L	13,1 mg/L

Fonte: O Autor (2017).

O pH do sobrenadante da digestão esteve dentro da faixa ótima para os micro-organismos metanogênicos em todos os ensaios estudados, tendo valores médios de 6,9 nos reatores INSN e PTSN, e 7,4 nos reatores INCN e PTCN. Valores superiores a 8,3 e inferiores a 6,0 são altamente prejudiciais às metanogênicas, devendo ser evitados (MCCARTHY, 1964). O potencial redox mais negativo nos reatores INCN e PTCN, -322 e -307 mV, respectivamente, indica um ambiente reduzido estritamente

anaeróbio e favorável à atividade metanogênica. Os parâmetros AGV e alcalinidade também foram mensurados com o objetivo de avaliar o equilíbrio do sistema. A Tabela 28 apresenta os valores médios de alcalinidade total e ácidos orgânicos, bem como as relações AGV/Alcalinidade finais do experimento.

Tabela 28 - Valores médios de alcalinidade total, AGV e relação AGV/ALC

Ensaio	Alcalinidade Total (CaCO ₃ mg/L)	AGV (mg/L)	AGV/ALC
INSN	95,86	10,30	0,107
INCN	461,79	2,80	0,006
PTSN	74,73	15,20	0,203
PTCN	433,12	3,30	0,007

Fonte: O Autor (2017).

A relação AGV/ALC funciona como um indicador da estabilidade dos reatores anaeróbios, e a partir da análise desses dados, observa-se que todos os reatores apresentaram valores inferiores a 0,3, indicando que a conversão de AGV a CH₄ se dava na mesma proporção em que esses ácidos eram produzidos. Quanto mais próxima de zero é essa relação, maior é a estabilidade do reator anaeróbio (AHRING *et al.*, 1995).

Quanto as concentrações de DQO solúvel, os maiores percentuais de redução foram observados nos reatores com biomassa de *Chlorella* sp. pré-tratada, cerca de 85 e 78% para as condições PTCN e PTSN, com concentrações iguais a 133 e 163 mg O₂/L, respectivamente. Enquanto que o pior desempenho foi observado a partir do reator INSN, com concentração final igual a 175 mg O₂/L.

5.4 Viabilidade energética

Na seção 5.4, a viabilidade dos experimentos conduzidos é avaliada a partir do contexto energético.

Conforme proposto por Ferrer *et al.* (2009; 2011), a viabilidade de implementação em larga escala dos pré-tratamentos aplicados nesse estudo foi investigada a partir do balanço energético.

O cálculo do balanço energético apenas foi praticável para os pré-tratamentos aplicados à biomassa mista de microalgas e cianobactérias (Experimento 2), uma vez que estes apresentaram resultados de produção de CH₄ superiores à biomassa mista *in natura* ao fim do processo de digestão. Enquanto que os rendimentos de CH₄ a partir da digestão da biomassa comercial de *Chlorella* sp. submetida a pré-tratamento hidrotérmico (Experimento 3) foram inferiores aqueles alcançados por suas respectivas versões com biomassa *in natura*, sendo assim extremamente desfavoráveis do ponto de vista energético.

Dado que nenhuma técnica de pré-tratamento, propriamente dita, tenha sido empregada à biomassa de *Chlorella vulgaris* no Experimento 1, este teve balanço energético positivo. Conforme Tabela 29, o potencial energético alcançado pela digestão *C. vulgaris* foi da ordem média de 9401 kJ/kg SV e 4934 kJ/kg SV para biomassa *in natura* e residual, respectivamente. O rendimento do poder calorífico do CH₄ acumulado pela digestão da biomassa pós extração foi de aproximadamente 53% do volume obtido a partir da biomassa *in natura*.

Tabela 29 - Rendimento energético obtido a partir da digestão da biomassa *in natura* e residual de *Chlorella vulgaris*

Ensaio	Reator	Teor de SV (%) kg/kg	Rendimento de Metano (L CH ₄ /kg SV)	Potencial energético (kJ/kg SV)	Potencial energético (kW.h/kg SV)
Digestão de biomassa <i>in natura</i>	BCAE 1	0,58	251,8	9014,44	2,50
	BCAE 2	0,58	262,1	9383,18	2,60
	BCAE 3	0,58	253,8	9806,04	2,72
Digestão de biomassa pós extração lipídica	BCPE 1	0,53	144,6	5176,68	1,44
	BCPE 2	0,53	132,0	4725,60	1,31
	BCPE 3	0,53	136,9	4901,02	1,36

Nota: Poder calorífico do CH₄: 38500 kJ/m³ nas CNTP (METCALF e EDDY, 2003).

Fonte: O Autor (2017).

O poder energético acumulado mediante a digestão da biomassa comercial *in natura* de *Chlorella* sp., sem e com adição de nutrientes, foi de 7429 kJ/kg SV e 19747

kJ/kg SV, respectivamente (Tabela 30). A adição de nutrientes teve influência positiva sobre o rendimento energético final, ao passo que a produção metanogênica foi estimulada pela suplementação.

Tabela 30 - Rendimento energético obtido a partir da digestão da biomassa comercial de *Chlorella* sp.

Ensaio	Reator	Teor de SV (%) kg/kg	Rendimento de Metano (L CH ₄ /kg SV)	Potencial energético (kJ/kg SV)	Potencial energético (kW.h/kg SV)
Digestão de biomassa <i>in natura</i> sem nutrientes	INSN 1	0,24	227,9	8158,82	2,26
	INSN 2	0,24	192,1	6905,82	1,92
	INSN 3	0,24	201,8	7224,44	2,01
Digestão de biomassa <i>in natura</i> com nutrientes	INCN 1	0,24	555,5	19886,92	5,52
	INCN 2	0,24	564,8	20219,85	5,62
	INCN 3	0,24	534,5	19135,13	5,31

Nota: Poder calorífico do CH₄: 38500 kJ/m³ nas CNTP (METCALF e EDDY, 2003).

Fonte: O Autor (2017).

No entanto, esse contexto é desfavorável. Não só porque a digestão foi a partir de uma biomassa comercial, o que acaba por gerar custos desnecessários, mas também de uma perspectiva nutricional, em que a suplementação é inviável à medida que os estudos procuram, não só fechar o ciclo energético mas também de recuperação de nutrientes mediante o processo de digestão. Sendo assim, um cenário fundamentado em compra de biomassa de microalgas e adição de nutrientes para fermentação é extremamente desvantajoso, econômico e financeiramente.

Quanto ao balanço energético dos pré-tratamentos, este foi determinado a partir da relação (Ee/Es): Entrada de energia (Ee) e Saída de Energia (Es). Assim sendo, para obtenção de um balanço energético favorável, a demanda energética deve ser superada ou, pelo menos, igualada à produção adicional de CH₄ alcançada a partir da execução das técnicas de pré-hidrólise. Isso significa dizer que valores iguais ou abaixo de 1 indicam saldo positivo de produção de energia ($Ee/Es \leq 1$).

Com base nos experimentos conduzidos, os balanços energéticos dos pré-tratamentos de ultrassom, micro-ondas e autoclavagem (Experimento 1) foram calculados e estão apresentados na Tabela 31. De novo, a entrada de energia (Ee) corresponde à energia total aplicada à biomassa durante a realização do pré-

tratamento, enquanto que a saída de energia (Es) corresponde ao poder calorífico do rendimento extra de CH₄/g SV obtido com relação à biomassa *in natura* controle.

Tabela 31 - Viabilidade energética dos pré-tratamentos com base no rendimento de CH₄ obtido a partir da digestão da biomassa mista

Pré-Tratamento	Reator	Teor de SV % (kg/kg)	Entrada de Energia (kJ/kg SV)	Saída de Energia (kJ/kg SV)	Balanço Energético (Ee/Es)	
Ultrassom	BMUS 1	0,66	91.393	1306,7	70	▼
	BMUS 2	0,66	91.393	1804,3	51	▼
	BMUS 3	0,66	91.393	1997,6	46	▼
Micro-ondas	BMMO 1	0,66	35.573	3068,1	12	▼
	BMMO 2	0,66	35.573	2971,4	12	▼
	BMMO 3	0,66	35.573	3157,6	11	▼
Autoclavagem	BMAC 1	0,64	15.348	5026,3	3,1	▼
	BMAC 2	0,64	15.348	4514,4	3,4	▼
	BMAC 3	0,64	15.348	4679,1	3,3	▼

Nota: Poder calorífico do CH₄: 38500 kJ/m³ nas CNTP (METCALF e EDDY, 2003).
Fonte: O Autor (2017).

A partir da observação da Tabela 31, é possível notar que a Relação Ee/Es variou de 3,1 a 70, indicando um balanço energético negativo, em que a produção de energia a partir da digestão anaeróbia do substrato pré-tratado foi inferior à quantidade requerida para realização de qualquer um dos pré-tratamentos para lise celular. O pré-tratamento ultrassônico apresentou a resposta mais negativa em termos de viabilidade energética (Ee/Es:~56), dentre todos os pré-tratamentos, mediante alto dispêndio de energia.

De forma similar, a fração energética demandada para aplicação do pré-tratamento via micro-ondas foi cerca de 12 vezes superior àquela produzida a partir da digestão da biomassa, apresentando também um balanço desfavorável. Estes valores estão em concordância com o que foi evidenciando por Hu *et al.* (2012), que encontraram relações Ee/Es situadas no intervalo 5-130 para pré tratamento de micro-ondas de biomassa lignocelulósica.

Com relação ao pré-tratamento térmico de autoclavagem, este foi o mecanismo que apresentou o maior equilíbrio entre a eletricidade demandada e a energia potencialmente produzida pela queima do CH₄ gerado na fermentação, obtendo uma

relação energética média da ordem de 3,3. No entanto, Passos e Ferrer (2014) relataram um balanço energético positivo (E_e/E_s : 0,59 e 0,56) a partir de pré-tratamento térmico de biomassa de microalgas a 75°C e 95°C por 10h, respectivamente.

Tal qual outros estudos (CHO *et al.* 2013; PASSOS *et al.* 2014d; PASSOS e FERRER, 2014), estes resultados defendem que o alto consumo de energia está atrelado à baixa relação de SV na biomassa de microalgas (0,64-0,66%). Quanto maior a concentração de SV na biomassa, menor é o consumo energético por g de SV na fase de pré-tratamento; O maior teor de SV predispõe o equilíbrio da relação consumo/produção de energia.

Adi *et al.* (2012) reportaram um cenário energeticamente favorável a partir da digestão anaeróbia de talos de algodão submetidos a pré-tratamento hidrotérmico atendendo a concentração de 10% de ST. De mesmo modo, Schwede *et al.* (2013) alcançaram um balanço energético positivo em quase 8 vezes, com relação à energia empregue no pré-tratamento hidrotérmico (120°C; 2h) de *Nannochloropsis salina* mediante centrifugação para concentração dos ST da biomassa, que variaram entre 16 e 30%. No entanto, o teor da ordem de 20% de SV, empregado neste estudo, é considerado inviável em escala real.

Em resumo, embora o pré-tratamento térmico apresente certa viabilidade quando comparado aos pré-tratamentos mecânicos de ultrassom e micro-ondas, o consumo energético, em todos os casos, superou a energia produzida a partir do processo de digestão. Desta forma, visando a implementação destes mecanismos de pré-hidrólise em larga escala, seguidos de digestão anaeróbia, a concentração de ST da biomassa precisa ser muito superior para o alcance de um contexto energeticamente positivo.

6 CONCLUSÕES

- Os mecanismos de pré-tratamento para lise celular de microalgas e cianobactérias tiveram efeitos positivos sobre o grau de solubilização da biomassa. Todos os 3 experimentos de digestão produziram CH₄, estando seu rendimento correlacionado positivamente com o emprego das técnicas de pré-hidrólise. No entanto, no Experimento 3, o rendimento de CH₄ não foi potencializado pela aplicação do pré-tratamento à biomassa de *Chlorella* sp.
- A extração de lipídios favoreceu a solubilização da biomassa residual de *Chlorella vulgaris* em 36%, no experimento 1. Efeitos positivos também foram observados no experimento 2, onde os pré-tratamentos de autoclavagem, micro-ondas e ultrassom promoveram parcelas de solubilização da biomassa mista da ordem de 41%, 28% e 15%, respectivamente. Já no experimento 3, a aplicação do pré-tratamento de autoclavagem à biomassa comercial de *Chlorella* sp. resultou em 47% de solubilização.
- No experimento 1, os rendimentos de CH₄ foram da ordem de 256 ml CH₄/g SV e 138 ml CH₄/g SV, com biodegradabilidade de 63 e 54%, para biomassa *in natura* e residual de *Chlorella vulgaris*, respectivamente. Ainda assim, a biomassa residual foi capaz de render 54% do volume de CH₄ alcançado pela digestão da biomassa íntegra. No experimento 2, o maior rendimento de CH₄ foi relatado a partir da biomassa mista pré-tratada por autoclavagem, cerca de 285 ml CH₄/g SV, superior em 87% ao alcançado pela biomassa controle. Enquanto que para o substrato pré tratado por micro-ondas e ultrassom, os volumes acumulados foram de 238 ml CH₄/g SV e 200 ml CH₄/g SV, respectivamente, representando 56% e 31% de aumento. A biodegradabilidade média dentre as biomassas pré-tratadas foi de 69%. O experimento 3 apresentou biodegradabilidade anaeróbia média de 33%, e as maiores produções foram observadas nos reatores que receberam suplementação nutricional, sendo da ordem de 537 ml CH₄/g SV e 353 ml CH₄/g SV, para biomassa comercial de *Chlorella* sp. *in natura* e pré-tratada termicamente, respectivamente. Por outro lado, os reatores com biomassa *in natura* e

autoclavada que não receberam adição de nutrientes renderam 208 ml CH₄/g SV e 178 ml CH₄/g SV, respectivamente.

- No experimento 3, a suplementação nutricional potencializou a produção de CH₄ a partir da digestão da biomassa comercial de *Chlorella* sp., sendo superior em cerca de 128%, com relação aos reatores que não foram suplementados. O consórcio bacteriano foi influenciado positivamente pelos elementos traços presentes na solução nutritiva.
- Quanto ao efluente da digestão, altas concentrações finais de NH₄⁺ foram relatadas em todos os 3 experimentos, resultado da digestão do substrato rico em proteínas, alcançando concentração média igual a 310 mg NH₄⁺/L. Nos experimentos 1 e 2, as concentrações finais de fósforo foram superiores às iniciais em cerca de 4,3 e 6 vezes, respectivamente. Desta forma, o sobrenadante apresentou potencial para utilização no cultivo de microalgas, mediante relação N:P média igual a 7:1.
- O balanço energético do experimento 1 foi positivo, dado que nenhum pré-tratamento foi aplicado à biomassa de *C. vulgaris*, o potencial energético médio alcançado pela digestão foi de 9401 kJ/kg SV e 4934 kJ/kg SV para o substrato controle e residual, respectivamente. No experimento 2, o balanço de energia foi negativo em todos os pré-tratamentos, no entanto, o tratamento térmico de autoclavagem apresentou o resultado mais favorável. O experimento 3 apresentou a resposta mais desfavorável quanto ao equilíbrio energético, uma vez que a aplicação do pré-tratamento não potencializou a produção de CH₄. Ainda assim, a digestão da biomassa *in natura* rendeu um potencial energético médio da ordem 13588 kJ/kg SV.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Ahmed EM *et al.* Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 157, p. 140-148, 2014.
- AGBOR, Valery B. *et al.* Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AHMAD, A. L. *et al.* Crossflow microfiltration of microalgae biomass for biofuel production. **Desalination**, v. 302, p. 65-70, 2012.
- AHRING, Birgitte Kiær; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, Irini. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 559-565, 1995.
- ALAM, Firoz *et al.* Biofuel from algae-Is it a viable alternative?. **Procedia Engineering**, v. 49, p. 221-227, 2012.
- ALZATE, M. E. *et al.* Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488-494, 2012.
- AMIN, Sarmidi. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy conversion and management**, v. 50, n. 7, p. 1834-1840, 2009.
- ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 560-564, 1993.
- ANGELIDAKI, Irini; ELLEGAARD, L. Anaerobic digestion in Denmark: Past, present and future. In: **7th FAO/SREN-Workshop**. Department of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, Moscow State University, 2002. p. 129-138.
- ANGELIDAKI, Irini; SANDERS, Wendy. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 117-129, 2004.
- APHA, A. W. W. A. WEF 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, v. 22, 2012.
- AQUINO, Sergio Francisco de *et al.* **Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios**. 2007.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. Abdul. Biodiesel separation and purification: a review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 2, p. 437-443, 2011.

AZEVEDO, S.M.F.O. 1998. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. *Medicina on-line* 1(3).

BARBOSA, T.S. Cianobactérias tóxicas e processos de remoção. Belo Horizonte – MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009, 68p.

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

BANIK, S. *et al.* Effect of microwave irradiated *Methanosarcina barkeri* DSM-804 on biomethanation. **Bioresource technology**, v. 97, n. 6, p. 819-823, 2006.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gênero de algas continentais brasileiras: chave de identificação e descrição. **Book in portuguese]. RIMA, São Carlos**, 2005.

BITTON, Gabriel. Anaerobic digestion of wastewater and sludge. **Wastewater Microbiology**, p. 229-245, 1994.

BOHUTSKYI, Pavlo; BOUWER, Edward. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs. In: **Advanced biofuels and bioproducts**. Springer New York, 2013. p. 873-975.

BORGES-CAMPOS, Viviane; BARBARINO, Elisabete; LOURENÇO, Sergio de Oliveira. Growth and chemical composition of ten species of marine microalgae in batch cultures. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 309-317, 2010.

BOROWITZKA, Michael A. Algal biotechnology products and processes—matching science and economics. **Journal of applied phycology**, v. 4, n. 3, p. 267-279, 1992.

BRASIL, Microalgas são usadas para produção de biocombustíveis 2017 Acesso em 06 de agosto de 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2017/03/microalgas-sao-usadas-para-producao-de-biocombustiveis>>

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BUX, Faizal; CHISTI, Yusuf (Ed.). **Algae Biotechnology: Products and Processes**. Springer, 2016.

BUXY, Samriddhi; DILTZ, Robert; PULLAMMANAPPALLIL, Pratap. Biogasification of marine algae *Nannochloropsis oculata*. **Materials Challenges in Alternative and Renewable Energy II: Ceramic Transactions**, p. 59-67, 2013.

CABANELAS, Iago Teles Dominguez *et al.* Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. **Bioresource technology**, v. 131, p. 429-436, 2013.

CAI, Ting *et al.* Comparison of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Nannochloropsis salina* for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent. **Bioresource technology**, v. 144, p. 255-260, 2013.

CAI, Ting; PARK, Stephen Y.; LI, Yebo. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CARDOZO, Karina HM *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 60-78, 2007.

CARRÈRE, H. *et al.* Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 183, n. 1, p. 1-15, 2010.

CARVALHO, Ana P.; MEIRELES, Luís A.; MALCATA, F. Xavier. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 6, p. 1490-1506, 2006.

CHEN, Chun-Yen *et al.* Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHEN, Paris Honglay; OSWALD, William J. Thermochemical treatment for algal fermentation. **Environment International**, v. 24, n. 8, p. 889-897, 1998.

CHEN, Ye; CHENG, Jay J.; CREAMER, Kurt S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4044-4064, 2008.

CHENG, Pengfei *et al.* The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. **Bioresource technology**, v. 138, p. 95-100, 2013.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos *et al.* **Reatores anaeróbios**. UFMG, 1997.

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

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

CHO, Sunja *et al.* Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. **Bioresource technology**, v. 131, p. 515-520, 2013.

CIFERRI, Orio. Spirulina, the edible microorganism. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 4, p. 551, 1983.

COLLET, Pierre *et al.* Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 207-214, 2011.

COSTA, Jorge Alberto Vieira; DE MORAIS, Michele Greque. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 2-9, 2011.

DAL MAGRO, Clinei *et al.* Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1139-1145, 2013.

DALRYMPLE, Omatoyo K. *et al.* Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. **Aquatic biosystems**, v. 9, n. 1, p. 2, 2013.

DEBOWSKI, Marcin *et al.* Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 596-604, 2013.

DEMIRBAS, Ayhan; DEMIRBAS, M. Fatih. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy conversion and management**, v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 992-998, 2011.

DE MORAIS, Michele Greque; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of biotechnology**, v. 129, n. 3, p. 439-445, 2007.

DERENNE, S. *et al.* Non-hydrolysable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1923-1929, 1992.

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

DE SOUZA, Marcos Eduardo. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia ("). **Revista DAE, São Paulo**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984.

DISMUKES, G. Charles *et al.* Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 235-240, 2008.

DOKULIL, Martin T.; TEUBNER, Katrin. Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiologia**, v. 438, n. 1, p. 1-12, 2000.

DOSHI, Hiren; RAY, Arabinda; KOTHARI, I. L. Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: spectroscopic, kinetics and SEM studies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 1051-1063, 2007.

DOUŠKOVÁ, Irena *et al.* Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 3, p. 606-611, 2010.

ESKICIOGLU, C.; KENNEDY, K. J.; DROSTE, R. L. Enhanced disinfection and methane production from sewage sludge by microwave irradiation. **Desalination**, v. 248, n. 1-3, p. 279-285, 2009.

EHIMEN, Ehiaze A. *et al.* Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. **Gcb Bioenergy**, v. 1, n. 6, p. 371-381, 2009.

ESPOSITO, Giovanni *et al.* Bio-methane potential tests to measure the biogas production from the digestion and co-digestion of complex organic substrates. **The Open Environmental Engineering Journal**, v. 5, n. 1, 2012.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I. Dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid wastes: Solid retention time optimization. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 435-440, 2014.

FERRER, I., Serrano, E., Ponsá, S., Vázquez, F., Font, X. Enhancement of thermophilic anaerobic digestion by 70°C pretreatment: energy considerations. **J. Residuals Sci. Tech.**, 59, 1777–1784. 2009.

FERRER, I., Vázquez, F., Font, X., Comparison of the mesophilic and thermophilic anaerobic sludge digestion from an energy perspective. **J. Residuals Sci. Technol.** 8, 81–87. 2011.

FOREE, Edward G.; MCCARTY, Perry L. Anaerobic decomposition of algae. **Environmental science & technology**, v. 4, n. 10, p. 842-849, 1970.

FLORENCIO, Lourdinha *et al.* Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 368-374, 1993.

GOLUEKE, Clarence G.; OSWALD, William Joseph; GOTAAS, Harold Benedict. Anaerobic digestion of algae. **Applied microbiology**, v. 5, n. 1, p. 47, 1957.

GOLUEKE, C. G. Principles of composting-Designing a well-operated facility. **Biocycle Journal of Composting & Recycling (eds.). Composting source separated organic. The JG Press. Inc. USA**, p. 12-15, 1994.

GONZÁLEZ-DELGADO, Ángel-Darío; KAFAROV, Viatcheslav. Microalgae based biorefinery: Issues to consider. **CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 4, n. 4, p. 5-22, 2011a.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Cristina; MOLINUEVO-SALCES, Beatriz; GARCÍA-GONZÁLEZ, Maria Cruz. Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. **Applied energy**, v. 88, n. 10, p. 3448-3453, 2011b.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. **Bioresource technology**, v. 110, p. 610-616, 2012a.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. **Biomass and bioenergy**, v. 40, p. 105-111, 2012b.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Cristina *et al.* Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 2, p. 205-218, 2012c.

GONZALEZ-FERNANDEZ, Cristina; SIALVE, Bruno; MOLINUEVO-SALCES, Beatriz. Anaerobic digestion of microalgal biomass: challenges, opportunities and research needs. **Bioresource technology**, v. 198, p. 896-906, 2015.

GHADIRYANFAR, Mohsen *et al.* A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 473-481, 2016.

GRIFFITHS, Melinda J.; VAN HILLE, Robert P.; HARRISON, Susan TL. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 989-1001, 2012.

GROBBELAAR, Johan U. Algal Nutrition–Mineral Nutrition. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, p. 95-115, 2004.

GRUBER-BRUNHUMER, M. R. *et al.* Associated effects of storage and mechanical pre-treatments of microalgae biomass on biomethane yields in anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 259-268, 2016.

HANNON, Michael *et al.* Biofuels from algae: challenges and potential. **Biofuels**, v. 1, n. 5, p. 763-784, 2010.

HARUN, Razif *et al.* Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

IMAI, M. IKARI, K. SUZUKI I., High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment, **Biochem. Eng. J.** 17 (2) 79–83. Feb. 2004

INGLESBY, Alister E.; FISHER, Adrian C. Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 7, p. 7996-8006, 2012.

JANKOWSKA, Ewelina; SAHU, Ashish K.; OLESKOWICZ-POPIEL, Piotr. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2016.

JARD, G. *et al.* Effect of thermochemical pretreatment on the solubilization and anaerobic biodegradability of the red macroalga *Palmaria palmata*. **Biochemical engineering journal**, v. 79, p. 253-258, 2013.

JCU Australia. James Cook University. Algae turns heavy metals green. 2017
Disponível em: <https://www.jcu.edu.au/news/releases/2017/april/algae-turns-heavy-metals-green2>

JONES, Carla S.; MAYFIELD, Stephen P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 346-351, 2012.

KAYHANIAN, M. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. **Environmental Technology**, v. 20, n. 4, p. 355-365, 1999.

KEYMER, Philip *et al.* 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.

KHANAL, Samir Kumar *et al.* Ultrasound applications in wastewater sludge pretreatment: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 277-313, 2007.

KINNUNEN, Viljami; CRAGGS, Rupert; RINTALA, Jukka. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating-volume reactor. **Water research**, v. 57, p. 247-257, 2014.

KUMAR, Rajeev; WYMAN, C. E. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 457-467, 2009.

LEE, A.K., Lewis, D.A., Ashman, P.J., Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. **Biomass Bioenergy** 46, 89–101. 2012.

LEE, Ji *et al.* Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource technology**, v. 127, p. 119-125, 2013.

LEE, Kwanyong *et al.* Ultrasound pretreatment of filamentous algal biomass for enhanced biogas production. **Waste management**, v. 34, n. 6, p. 1035-1040, 2014.

LEGNANI, Elena *et al.* *Planktothrix rubescens*' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy). **Journal of Limnology**, v. 64, n. 1, p. 61-73, 2005.

LU, J., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Mladenovska, Z., Ahring, B.K., Improving anaerobic sewage sludge digestion by implementation of a hyperthermophilic prehydrolysis step. **J. Environ. Manage.** 88, 881–889. 2008.

MAHDY, Ahmed *et al.* Algaculture integration in conventional wastewater treatment plants: anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. **Bioresource technology**, v. 184, p. 236-244, 2015.

MALLICK, Nirupama. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. **biometals**, v. 15, n. 4, p. 377-390, 2002.

MATA, Teresa M.; MARTINS, Antonio A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MCCARTY, Perry L. Anaerobic waste treatment fundamentals. **Public works**, v. 95, n. 9, p. 107-112, 1964.

MENDEZ, Lara *et al.* Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. **Bioresource technology**, v. 149, p. 136-141, 2013.

MENDEZ, Lara *et al.* Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: organic matter solubilisation and biochemical methane potential. **Fuel**, v. 117, p. 674-679, 2014.

METCALF & EDDY, Boston; TCHOBANOGLOUS, George. **Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse**. Central Book Company, 2006.

METCALF, E. EDDY; EDDY, H. P. **Wastewater engineer treatment disposal, reuse**. New York: McGraw, 2003.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A.G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M.C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MOODY, Jeffrey W.; MCGINTY, Christopher M.; QUINN, Jason C. Global evaluation of biofuel potential from microalgae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 23, p. 8691-8696, 2014.

MONTEGGIA, Luiz Olinto *et al.* Remoção físico-química de algas e fósforo de efluentes de lagoas de alta taxa. In: **Coletânea de trabalhos técnicos**. PROSAB, 2001. p. 97-102.

MONTGOMERY, Lucy FR; BOCHMANN, Günther. Pretreatment of feedstock for enhanced biogas production. **IEA Bioenergy**, p. 1-20, 2014.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8-9, p. 209-232, 1983.

MUNOZ, Raul; GUIEYSSE, Benoit. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water research**, v. 40, n. 15, p. 2799-2815, 2006.

MUSSGNUG, Jan H. *et al.* Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 51-56, 2010.

MUTANDA, T. *et al.* Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 57-70, 2011.

NASCIMENTO, Jean Ricardo da Silva *et al.* Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios em lagoas de alta taxa de produção de algas. In: **Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**, 27. ABES, 2000. p. 1-8 [tl].

OCEAN DROP. Microalgas: é de comer? Acesso em março de 2017. Disponível em: <https://my.oceandrop.com.br/microalgas/>.

OMETTO, Francesco *et al.* Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. **Water research**, v. 65, p. 350-361, 2014.

OSWALD, William J.; GOLUEKE, Claence G. Biological transformation of solar energy. **Advances in applied microbiology**, v. 2, p. 223-262, 1960.

OSWALD, William J.; GOLUEKE, Clarence G.; TYLER, Robert W. Integrated pond systems for subdivisions. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 1289-1304, 1967.

PARK, Stephen; LI, Yebo. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. **Bioresource technology**, v. 111, p. 42-48, 2012.

PARK, Ki Young *et al.* Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 598-602, 2013.

PARKIN, Gene F.; OWEN, William F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. **Journal of Environmental Engineering**, v. 112, n. 5, p. 867-920, 1986.

PASSOS, Fabiana; GARCÍA, Joan; FERRER, Ivet. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. **Bioresource technology**, v. 138, p. 79-86, 2013a.

_____, Fabiana *et al.* Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment. **Applied Energy**, v. 108, p. 168-175, 2013b.

_____., Fabiana *et al.* Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. **Water research**, v. 49, p. 351-359, 2014a.

_____., Fabiana; ASTALS, Sergi; FERRER, Ivet. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. **Waste management**, v. 34, n. 11, p. 2098-2103, 2014b.

_____., Fabiana *et al.* Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. **Bioresource technology**, v. 172, p. 403-412, 2014c.

_____., Fabiana; FERRER, Ivet. Microalgae conversion to biogas: thermal pretreatment contribution on net energy production. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 12, p. 7171-7178, 2014d.

_____., Fabiana *et al.* Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. **Bioresource technology**, v. 199, p. 347-351, 2016.

PAPAZI, Aikaterini; MAKRIDIS, Pavlos; DIVANACH, Pascal. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 349-355, 2010.

PATIL, Prafulla D. *et al.* In situ ethyl ester production from wet algal biomass under microwave-mediated supercritical ethanol conditions. **Bioresource technology**, v. 139, p. 308-315, 2013.

PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

PRAJAPATI, Sanjeev Kumar *et al.* Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: possibilities and challenges. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1408-1425, 2013.

_____., Sanjeev Kumar; MALIK, Anushree; VIJAY, Virendra Kumar. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 114, p. 790-797, 2014.

PRIYADARSHANI, Indira; RATH, Biswajit. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. **J algal biomass utln**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

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

RADMANN, Elisângela Martha. Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes. 2011.

RAPOSO, F. *et al.* Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 8, p. 1088-1098, 2011.

RAMAMOORTHY S., SULOCHANA N., Enhancement of biogas production using algae, **Curr. Sci.** 58 646–647. 1989.

RAS, Monique *et al.* Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 200-206, 2011.

RASHID, Naim *et al.* Enhanced electricity generation by using algae biomass and activated sludge in microbial fuel cell. **Science of the Total Environment**, v. 456, p. 91-94, 2013.

RAWAT, I. *et al.* Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, 2011.

RAZON, Luis F.; TAN, Raymond R. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3507-3514, 2011.

RECIFE, Decreto nº 22.460, de 01 de dezembro de 2006. Regulamentação da Unidade de Conservação APA Açude de Apipucos. Recife. 2006.

RINZEMA, Arjen; VAN LIER, Jules; LETTINGA, Gatzke. Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 1, p. 24-32, 1988.

RODRIGUEZ, C. *et al.* Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. **Fuel processing technology**, v. 138, p. 765-779, 2015.

SAHARAN, Baljeet Singh *et al.* Towards algal biofuel production: a concept of green bio energy development. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 12, p. 1, 2013.

SAMSON, R.; LEDUY, A. Improved performance of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass by addition of carbon-rich wastes. **Biotechnology letters**, v. 5, n. 10, p. 677-682, 1983.

HERNÁNDEZ, EP Sánchez; CÓRDOBA, L. Travieso. Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. **Resources, conservation and recycling**, v. 9, n. 1-2, p. 127-132, 1993.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of energy research**, v. 35, n. 4, p. 291-311, 2011.

SCHWEDE, Sebastian *et al.* Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. **Bioresource technology**, v. 143, p. 505-511, 2013.

SFORZA, Eleonora *et al.* Anaerobic digestion of lipid-extracted microalgae: Enhancing nutrient recovery towards a closed loop recycling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 139-146, 2017.

SHAH, Syed Hasnain *et al.* Potential of microalgal biodiesel production and its sustainability perspectives in Pakistan. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 76-92, 2018.

SHILTON, Andy; GUIEYSSE, Benoit. Sustainable sunlight to biogas is via marginal organics. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 287-291, 2010.

SYDNEY, Eduardo Bittencourt *et al.* Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource technology**, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, 2010.

SINGH, Jasvinder; GU, Sai. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.

SINGH, Anoop; OLSEN, Stig Irving. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3548-3555, 2011.

SIALVE, Bruno; BERNET, Nicolas; BERNARD, Olivier. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 4, p. 409-416, 2009.

SOLÉ-BUNDÓ, Maria *et al.* Anaerobic co-digestion of microalgal biomass and wheat straw with and without thermo-alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 89-98, 2017.

SOXHLET, F. The weight analytic determination of milk fat. *Polytechnisches J*, v. 232, p. 461-465, 1879.

SPOLAORE, Pauline *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STEPHENS, Evan *et al.* Future prospects of microalgal biofuel production systems. **Trends in plant science**, v. 15, n. 10, p. 554-564, 2010.

STRONG, P. J.; GAPES, D. J. Thermal and thermo-chemical pre-treatment of four waste residues and the effect on acetic acid production and methane synthesis. **Waste management**, v. 32, n. 9, p. 1669-1677, 2012.

SYMONS, G. E.; BUSWELL, A. M. The methane fermentation of carbohydrates¹, 2. **Journal of the American Chemical Society**, v. 55, n. 5, p. 2028-2036, 1933.

TERCERO, EA Ramos *et al.* Cultivation of *Chlorella* protothecoides with urban wastewater in continuous photobioreactor: biomass productivity and nutrient removal. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1470-1485, 2014.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, J. S. Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. **Biochemical Journal**, v. 50, n. 3, p. 298, 1952.

UDUMAN, Nyomi *et al.* Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 3, p. 935-940, 2010.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 789-807, 2011.

VERGARA-FERNÁNDEZ, Alberto *et al.* Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 4, p. 338-344, 2008.

VOLLENWEIDER, Richard A. *et al.* **Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication**. Paris: Organisation for economic co-operation and development, 1971.

VONSHAK, Avigad; RICHMOND, Amos. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. **Biomass**, v. 15, n. 4, p. 233-247, 1988.

WANG, Bei; LAN, Christopher Q. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5639-5644, 2011.

- WANG, Ning-Xin *et al.* Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes. **Water research**, v. 47, n. 7, p. 2497-2506, 2013.
- WARD, A. J.; LEWIS, D. M.; GREEN, F. B. Anaerobic digestion of algae biomass: a review. **Algal Research**, v. 5, p. 204-214, 2014.
- WIEGANT, W. M.; ZEEMAN, G. The mechanism of ammonia inhibition in the thermophilic digestion of livestock wastes. **Agricultural Wastes**, v. 16, n. 4, p. 243-253, 1986.
- WILLIAMS, Peter J. le B.; LAURENS, Lieve ML. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 5, p. 554-590, 2010.
- WILSON, Christopher A.; NOVAK, John T. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. **Water research**, v. 43, n. 18, p. 4489-4498, 2009.
- WIJFFELS, René H.; BARBOSA, Maria J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 796-799, 2010.
- XIA, Ao *et al.* Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids through co-fermentation of macro-and micro-algae. **Bioresource technology**, v. 205, p. 118-125, 2016.
- XU, H., MIAO, X. & WU, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126: 499-507.
- YANG, Z. *et al.*, Hydrogen and methane production from lipid extracted microbial biomass residues, *Int. J. Hydrogen Energy* 36 3465–3470, 2010.
- YANG, Jia *et al.* Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 159-165, 2011.
- YAUN, X., *et al.* Microalage growth using high strength wastewater followed by anaerobic digestion, *Water Environ. Res.* 84 (5) (2012) 396–404.
- YEN, Hong-Wei; BRUNE, David E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource technology**, v. 98, n. 1, p. 130-134, 2007.
- YUN, Yeo-Myeong *et al.* Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19256-19261, 2014.

ZAMALLOA, Carlos *et al.* The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1149-1158, 2011.

_____, Carlos *et al.* Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 859-869, 2012.

ZEEMAN, G. *et al.* The influence of the total-ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure. **Agricultural Wastes**, v. 14, n. 1, p. 19-35, 1985.

ZENG, Shujuan *et al.* Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n. 1, p. 89-93, 2010.

ZHAO, Baisuo *et al.* Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. **Bioresource technology**, v. 161, p. 423-430, 2014.

ZHANG, Lei; LEE, Yong-Woo; JAHNG, Deokjin. Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: focusing on the role of trace elements. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5048-5059, 2011.

ZHANG, Junya *et al.* Optimization and microbial community analysis of anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge based on microwave pretreatment. **Bioresource technology**, v. 200, p. 253-261, 2016.

ZHENG, Yubin *et al.* Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 484-488, 2012.

ZUPANČIČ, Gregor Drago; ROŠ, Milenko. Heat and energy requirements in thermophilic anaerobic sludge digestion. **Renewable energy**, v. 28, n. 14, p. 2255-2267, 2003.