



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

AGNES ADAM DUARTE PINHEIRO

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA DE ALGAS E VINHAÇA PARA
PRODUÇÃO DE METANO**

Recife

2023

AGNES ADAM DUARTE PINHEIRO

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA DE ALGAS E VINHAÇA PARA
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.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite.

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

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

P654c Pinheiro, Agnes Adam Duarte.
Codigestão anaeróbia de biomassa de algas e vinhaça para produção de metano / Agnes Adam Duarte Pinheiro. 2023.
85 f: il.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Recife, 2023.
Inclui referências.

1. Engenharia civil. 2. Hidrólise. 3. Reatores em dois estágios. 4. Pré-tratamento. 5. AGV. I. Leite, Wanderli Rogério Moreira (Orientador). II. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos (Coorientadora). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG / 2023 - 50

AGNES ADAM DUARTE PINHEIRO

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA DE ALGAS E VINHAÇA PARA
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.

Aprovada em: 23/02/2023

Orientador: Prof. Doutor Wanderli Rogério Moreira Leite

Coorientadora: Prof^a. Doutora Maria de Lourdes Florencio dos Santos

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Martins Sobral (examinador interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Motteran (examinador externo)

Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Prof. Dr. Jorge Manuel Rodrigues Tavares (examinador externo)

Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Beja, Portugal

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha fortaleza e me conceder força e resiliência para que pudesse seguir em frente, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de mestrado concedida.

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

Ao Grupo JB, Usina Alcoolquímica por contribuir com o desenvolvimento da pesquisa.

A minha mãe Rocicleide Rodrigues, por ser a minha base, por nunca ter desistido de ofertar o melhor a mim, pela educação, disciplina e todo esforço para garantir melhores condições de vida e sempre me incentivar a trilhar o meu caminho. Ao meu pai Célio Pinheiro, pela força e dedicação para estar ao meu lado me incentivando a buscar a minha felicidade.

A minha avó Rocilda Viana (*in memoriam*) por ter me amparado a vida inteira, sempre buscando o melhor para mim, para minha felicidade e bem-estar, e que embora já tenha partido, continua viva em meu coração.

Aos meus familiares, por sempre estarem dispostos a me ajudar, garantindo conforto e assistência, principalmente nesse período longe de casa. Aos meus tios e tias, por toda preocupação e apoio durante esses anos.

Aos meus professores, que desde o primário até o ensino superior foram fundamentais na minha formação pessoal e profissional.

Aos meu orientador Wanderli Leite por toda dedicação, paciência, sabedoria, apoio e acolhimento desde o momento da minha chegada em Recife. E a minha coorientadora Lourdinha Florencio, pela oportunidade, pelos ensinamentos, incentivos e contribuição.

Aos técnicos do LSA, Danúbia, Ronaldo e Iago, pela ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos.

A todos os meus amigos, que me ajudaram a trilhar grandes momentos com muito apoio emocional, sendo sempre disponíveis ofertando muita força, energia positiva e momentos incríveis de descontração.

Aos amigos do LSA, especialmente Ana Iacy, Edilberto Mariano, Sayonara Costa, Jocimar Rodrigues, Alynne Soares, Marília Marques, Devson Palma, Marcus Vinícius, Joelithon Costa, Henrique Campos, Luiz Pereira. Ao amado grupo de digestão anaeróbia Gabriel, Dicla, Francielle Machado, Gisella Marília, Acson Gonçalves, que fizeram parte de

toda essa história, no auxílio que me deram durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

RESUMO

As microalgas são um substrato promissor para recuperação de energia através da produção de metano via digestão anaeróbia. Entretanto, a resistência à hidrólise devido a composição da parede celular, e consequente baixa relação carbono nitrogênio (C/N) é considerada um dos principais fatores limitantes da sua biodegradabilidade. Neste sentido, para melhorar a relação C/N e a biodegradabilidade da biomassa algal (BA), utilizou-se a vinhaça de cana-de-açúcar (V) como um cosubstrato para a codigestão anaeróbia, visando um aumento do rendimento de metano (CH₄). Dessa forma, foram realizados testes de potencial bioquímico de metano (PBM), delineados para averiguar se a mistura proporcionava melhores condições de estabilidade e rendimento. A codigestão dos substratos proporcionou um aumento de 120% no rendimento de CH₄ e 12% no efeito sinérgico em relação ao obtido na digestão anaeróbia de biomassa algal. A partir dos testes PBM, o escalonamento do processo de codigestão foi testado em sistema de reator de dois estágios durante 270 dias, um reator acidogênico (RA) que possuiu TDH e COV (com base em DQO) de 4 dias e 5,26 kg·m⁻³·d⁻¹ e um reator metanogênico (RM) com TDH e COV de 22 dias e 0,25 kg·m⁻³·d⁻¹, respectivamente, sendo analisadas três fases distintas. Verificou-se que um sistema de reatores de dois estágios pode ser conduzido para valorização de resíduos orgânicos de difícil biodegradabilidade, como a biomassa de microalgas, sendo, portanto, um tipo de pré-tratamento para substratos como a BA, principalmente aliadas a outros tipos de pré-tratamentos, como o utilizado neste trabalho.

Palavras-chave: hidrólise; reatores em dois estágios; pré-tratamento; AGV.

ABSTRACT

Microalgae are a promising substrate for energy recovery through methane production via anaerobic digestion. However, the resistance to hydrolysis due to the composition of the cell wall, and consequently the low carbon ratio (C/N) is considered one of the main limiting factors of its biodegradability. In this sense, to improve the C/N ratio and the biodegradability of algal biomass (BA), sugarcane vinasse (V) as a cosubstrate for anaerobic codigestion, aiming at an increase in methane (CH₄) yield. Thus, tests of the biochemical methane potential (BMP) were carried out, designed to verify whether the mixture provided better stability and yield conditions. The co-digestion of the substrates provided a 120% increase in the CH₄ yield and a 12% increase in the synergistic effect in relation to that obtained in the anaerobic digestion of algal biomass. From the PBM tests, the scaling of the co-digestion process was tested in the two-reactor system, during 270 days, an acidogenic reactor (RA) that had HRT and OLR of 4 days and 5.26 kg. m⁻³. d⁻¹, and a methanogenic reactor (RM) with HRT and OLR of 22 days and 0.25 kg. m⁻³. d⁻¹, respectively, three distinct phases were analyzed. It was verified that a two-stage reactor system can be conducted for the valorization of organic residues that are difficult to biodegrade, such as microalgae biomass, being, therefore, a type of pre-treatment for substrates such as BA, mainly combined with other types of pre-treatments, as used in this work.

Keywords: hydrolysis; two-stage reactors; pretreatment; VFA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo das rotas metabólicas da digestão anaeróbia	21
Figura 2 - Representação esquemática da digestão anaeróbia de biomassa de algas com os possíveis pontos de inibição	27
Figura 3 - Esquema das etapas metodológicas	36
Figura 4 - Coleta da biomassa algal: (a) lagoa de alta taxa. (b) concentração da biomassa algal com peneira 0,250mm.....	37
Figura 5 - Coleta de vinhaça: (a) usina de produção de açúcar e etanol. (b) vinhaça de cana-de-açúcar	38
Figura 6 - Esquematização do aparato utilizado nos testes PBM: (a) frasco reator. (b) garrafa de vidro contendo solução de NaOH. (c) recipiente de plástico para coleta de líquido deslocado.....	41
Figura 7 - Reatores instalados na sala termostatizada no LSA, UFPE.....	42
Figura 8 - Reatores anaeróbios de dois estágios em escala piloto.....	44
Figura 9 - Fluxograma das fases experimentais.	46
Figura 10 - Imagem microscópica da biomassa algal oriunda da LAT. Magnitude: 40x	51
Figura 11 - PBM acumulado para as condições de digestão e codigestão testadas	56
Figura 12 - Variação do pH do reator acidogênico ao longo do tempo	57
Figura 13 - Ácidos graxos voláteis presentes no efluente do RA: (a) concentração ao longo do tempo (b) distribuição proporcional	60
Figura 14 - Concentração de nitrogênio amoniacal no reator acidogênico	61
Figura 15 - Variáveis relacionadas à estabilidade do reator metanogênico: (a) pH. (b) alcalinidade parcial (AP) (c) razão alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial (AI/AP).....	64
Figura 16 - Concentração de nitrogênio amoniacal no reator metanogênico.....	66
Figura 17 - Rendimento de metano por massa de DQO adicionada no reator metanogênico.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dimensões da lagoa de alta taxa	38
Tabela 2 -	Parâmetros e métodos analíticos da caracterização de inóculo e substratos ..	39
Tabela 3 -	Condições cromatográficas para análise de AGV	39
Tabela 4 -	Condições cromatográficas para análise de composição do biogás	42
Tabela 5 -	Condições operacionais do reator acidogênico (RA).....	45
Tabela 6 -	Condições operacionais do reator metanogênico (RM)	45
Tabela 7 -	Parâmetros de desempenho e estabilidade dos reatores	48
Tabela 8 -	Caracterização do lodo utilizado como inóculo	50
Tabela 9 -	Caracterização da biomassa algal utilizada nos experimentos.....	52
Tabela 10 -	Caracterização da vinhaça utilizada nos experimentos	52
Tabela 11 -	Caracterização da biomassa algal após o pré-tratamento.....	53
Tabela 12 -	Caracterização dos cosubstratos biomassa algal (sem e com pré-tratamento) e vinhaça (50:50).....	54
Tabela 13 -	Relação C/N, PBM, percentual de metano no biogás, biodegradabilidade e índice de sinergia (média ± desvio padrão).....	55
Tabela 14 -	Carga orgânica aplicada para o sistema de dois estágios	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
APHA	Associação Americana de Saúde Pública
C/N	Relação carbono-nitrogênio
CH ₄	Gás metano
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
CO ₂	Gás carbônico
COT	Carbono Orgânico Total
CTG	Centro de Tecnologia e Geociências
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DA	Digestão Anaeróbia
DQOs	Demanda Química de Oxigênio solúvel
DQOt	Demanda Química de oxigênio total
GC-FID	Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama
GC-TCD	Cromatógrafo gasoso com detector de condutividade térmica
GEE	Gases de Efeito Estufa
H ₂	Gás hidrogênio
H ₂ S	Gás sulfídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
I/S	Relação inóculo/substrato
IS	Índice de Sinergia
LAT	Lagoa de Alta Taxa
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
m/v	Relação massa/volume
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Amônio
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
PBM	Potencial Bioquímico de Metano
pH	Potencial hidrogeniônico

RA	Reator Acidogênico
RM	Reator Metanogênico
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	GERAL.....	17
2.2	ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	ECONOMIA CIRCULAR DE RESÍDUOS.....	18
3.2	DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	19
3.3	FATORES QUE INFLUENCIAM O PROCESSO ANAERÓBIO	22
3.4	DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL	24
3.4.1	Microalgas	24
3.4.2	Limitações da utilização de biomassa algal.....	26
3.5	MECANISMOS PARA OTIMIZAR O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	28
3.5.1	Codigestão anaeróbia.....	28
3.5.2	Sistema de dois estágios	29
3.5.3	Pré-tratamentos	31
3.6	RECUPERAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE VALOR AGREGADO	33
3.6.1	Biogás	33
3.6.2	Ácidos graxos voláteis	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO E SUBSTRATOS.....	36
4.1.1	Inóculo	36
4.1.2	Substratos.....	37
4.1.3	Métodos analíticos	39
4.2	TESTES DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM).....	40
4.2.1	Biodegradabilidade anaeróbia.....	43
4.2.2	Índice de sinergia (IS).....	43
4.3	EXPERIMENTO SEMICONTÍNUO DE DOIS ESTÁGIOS.....	44
4.3.1	Condições operacionais do reator acidogênico (RA)	44
4.3.2	Condições operacionais do reator metanogênico (RM).....	45
4.3.3	Fases experimentais	46
4.3.4	Cálculo das condições operacionais hidráulicas	46

4.3.5	Método de alimentação dos reatores.....	47
4.3.6	Avaliação do desempenho e estabilidade dos reatores: Métodos analíticos.....	47
4.3.7	Pré-tratamento térmico da biomassa algal	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO	50
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS	50
5.2.1	Caracterização da biomassa pré-tratada.....	53
5.2.2	Caracterização do cosubstrato (alimentação) do sistema de dois estágios	54
5.3	TESTES DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO	54
5.4	EXPERIMENTO SEMICONTÍNUO DE DOIS ESTÁGIOS.....	57
5.4.1	Estabilidade do reator acidogênico (RA).....	57
5.4.2	Estabilidade do reator metanogênico (RM).....	63
5.4.3	Desempenho do reator metanogênico na produção de metano	67
5.4.4	Remoção de matéria orgânica.....	70
6	CONCLUSÕES.....	72
7	RECOMENDAÇÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de fontes limpas de energia, assim como o gerenciamento de resíduos sólidos, são alguns dos problemas encontrados atualmente. Entretanto, é possível encontrar um alto potencial de geração de energia renovável a partir de resíduos orgânicos, podendo ser uma alternativa contribuinte para o desenvolvimento sustentável da sociedade atual e futura (WAINAINA et al., 2020).

Com base nesse aspecto, a digestão anaeróbia é uma das tecnologias mais utilizadas para o tratamento de resíduos biodegradáveis a fim de alcançar uma produção de energia renovável, quando recuperada e utilizada (DI MARIA et al., 2017). Sendo caracterizada como um processo bioquímico de conversão de matéria orgânica, possui fases distintas, desenvolvida por microrganismos específicos, na ausência de oxigênio, e está sendo amplamente utilizada com o objetivo de promover um melhor gerenciamento aos resíduos orgânicos e, conseqüentemente, gerar subprodutos de valor agregado (KIM et al., 2022).

A tecnologia de digestão em ambiente anaeróbio, apesar de apresentar diversas vantagens, quando utilizada para degradação de apenas um resíduo ou substrato orgânico possui algumas desvantagens como a ocorrência de alta concentração de nitrogênio amoniacal, situação desequilibrada de nutrientes, acidificação rápida e baixa capacidade de tamponamento (ZHEN et al., 2016; ZALA et al., 2020). A digestão anaeróbia de mais de um resíduo em um único digestor é denominada de codigestão anaeróbia e vem sendo considerada uma solução para as limitações da degradação de apenas um substrato, como a biomassa algal (LI et al., 2017; RODRIGUEZ et al., 2018).

A codigestão, em geral, melhora o rendimento dos digestores anaeróbios em virtude do sinergismo estabelecido. Esse efeito positivo pode ser relacionado ao balanço de nutrientes entre os substratos e/ou ao estímulo à produção de enzimas que aumentam a sua digestibilidade (AJEEJ et al., 2015). Além disso, há benefícios econômicos ao tratar mais de um resíduo em uma única instalação (WAINAINA et al., 2020).

Diversos resíduos orgânicos possuem o potencial para gerar energia. As microalgas, por exemplo, têm sido consideradas um resíduo com grande potencial energético visto que são ricas em carboidratos, proteínas e lipídios, os quais podem ser convertidos em biogás através da digestão anaeróbia e, conseqüentemente, podem representar uma alternativa para obtenção de energia (AYALA-PARRA et al., 2017). No entanto, limitações podem ser encontradas no seu processo de degradação devido a composição da parede celular que oferece resistência à hidrólise (ZHEN et al., 2016).

Um substrato potencial que pode ser codigerido com microalgas é a vinhaça da cana-de-acúcar, principal resíduo líquido do processo produtivo do etanol, o qual apresenta um elevado teor de matéria orgânica, potássio e sulfato, características ácidas e corrosivas. O alto teor orgânico biodegradável possibilita tornar esse subproduto uma alternativa valiosa na aplicação dos processos de digestão anaeróbia, visando à produção de outros compostos de valor agregado, como o biogás rico em metano (ENG SÁNCHEZ et al., 2021).

Além do processo de codigestão, estudos desenvolvidos com sistemas de dois estágios demonstraram uma ótima capacidade de aumentar a estabilidade do processo, melhorando o desempenho na produção de metano e eficiência de remoção de matéria orgânica, ou seja, além de produzir mais energia do que o sistema de estágio único, considerando aspectos ambientais proporciona a redução de carga poluente ao meio ambiente (KIANI DEH KIANI et al., 2022).

A digestão anaeróbia de dois estágios tem um grande potencial para se tornar uma abordagem de biorrefinaria sustentável para a produção de vários combustíveis e bioquímicos. Vários processos, como a fermentação dentro de um sistema de dois estágios, estão disponíveis para a produção de H_2 por exemplo, além de subprodutos intermediários valiosos, como os ácidos graxos voláteis (AGV), os quais são possíveis de serem extraídos do processo de digestão em ambiente anaeróbio.

A diversidade microbiana presente nos digestores anaeróbios depende de fatores como temperatura, matéria-prima, tempo de detenção hidráulica (TDH), carga orgânica volumétrica (COV), existência ou ausência de um pré-tratamento, entre outros, os quais são de extrema importância para o funcionamento adequado do reator.

Compreender o processo de digestão anaeróbia e os microrganismos que são responsáveis por cada etapa é crucial para o alcance do subproduto desejado, devido as características específicas, limitações e interações existentes em cada fase do metabolismo anaeróbio, principalmente na metanogênese, etapa esta que pode responder de maneira limitante quando não há um ambiente favorável para microrganismos específicos (HARIRCHI et al., 2022).

Diante desse exposto, pode-se considerar que o processo de codigestão e os sistema de dois estágios estão inteiramente ligados ao contexto de biorrefinarias, e essa aplicação em conjunto incentivam o estudo e a viabilidade técnica, econômica e ambiental, como estratégia de redução da disposição de resíduos, visando a recuperação de subprodutos de valor agregado, como como o biogás que posteriormente pode ser aproveitado para recuperação energética a partir do metano. Dessa forma, a utilização da biomassa algal em codigestão com a vinhaça para aumento da produção de biogás parece ser uma alternativa promissora para aproveitamento

energético destes resíduos, visando contornar os principais problemas da digestão anaeróbia das microalgas, além de possibilitar a redução de uma problemática encontrada mundialmente que, no Brasil, está estabelecida como um desafio a ser solucionado no Plano Nacional de Resíduos Sólidos (2012).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a produção de metano a partir da codigestão anaeróbia de biomassa algal e vinhaça de cana-de-açúcar.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de produção de metano em reatores de escala laboratorial;
- Avaliar o potencial de produção de AGV e metano em reator escala de bancada de dois estágios;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento térmico da biomassa algal no potencial de produção de AGV e metano;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ECONOMIA CIRCULAR DE RESÍDUOS

O crescente desenvolvimento econômico global proporcionou um aumento na procura por fontes alternativas de energia limpa, assim como um gerenciamento mais adequado dos resíduos sólidos. Entretanto, quando esses dois fatores são analisados em conjunto é possível encontrar um alto potencial de geração de energia renovável, podendo ser uma alternativa contribuinte para o desenvolvimento sustentável da sociedade atual e futura (WAINAINA et al., 2020).

No processo de economia circular, os principais fatores que delineiam e aperfeiçoam o gerenciamento dos resíduos são a reciclagem e a reutilização, que quando colocados em prática, tendem a reduzir os impactos negativos provocados por uma produção excessiva desses resíduos, além de promover um crescimento econômico, social e ambiental. Com isso, a economia circular, além de criar mais oportunidades de trabalho e proporcionar uma transformação dos resíduos em fontes de energia limpa, estimula o desenvolvimento de estudos que buscam alternativas mais sustentáveis para o aproveitamento dos resíduos (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2019; WAINAINA et al., 2020).

Diversas tecnologias desenvolvidas para o tratamento dos resíduos sólidos já são bastante conhecidas. Entretanto, em termos comparativos, os processos biológicos para o tratamento desses resíduos são considerados mais vantajosos por possuírem características de baixo consumo de energia, por serem mais econômicos e eficientes na remoção orgânica, além de atenderem os fundamentos da economia circular (SIDDIQUE; WAHID, 2018).

Como exemplo dos processos biológicos para o tratamento dos resíduos, a digestão anaeróbia (DA) é uma tecnologia muito conhecida e estudada mundialmente. O processo promove a decomposição e degradação dos resíduos possibilitando a produção de subprodutos como os ácidos graxos voláteis (AGV) e o biogás, rico em metano e dióxido de carbono, substâncias que possuem um grande potencial para serem utilizadas como combustível ou apenas para produzir energia (SIDDIQUE; WAHID, 2018; SOOBHANY, 2019).

Além do grande potencial energético do biogás, um benefício importante a ser considerado é o seu papel para o saneamento ambiental. O metabolismo anaeróbio proporciona destinação e tratamento dos resíduos orgânicos de maneira adequada, contribuindo para a mitigação dos impactos ambientais negativos e emissão dos Gases de Efeito Estufa (GEE).

3.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A DA é uma das tecnologias mais utilizadas para o tratamento de resíduos biodegradáveis, caracterizada como um processo bioquímico natural de conversão de matéria orgânica desenvolvido por microrganismos específicos, na ausência de oxigênio, com o objetivo de promover um melhor gerenciamento aos resíduos orgânicos e alcançar subprodutos de valor agregado (KIM et al., 2022).

A degradação da matéria orgânica se desenvolve em quatro estágios bioquímicos: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Em cada etapa, grupos específicos de microrganismos desempenham papéis importantes para promover um mecanismo bem desenvolvido e equilibrado (DUGBA; ZHANG, 1999).

Um ponto importante a ser considerado para que o processo de DA seja o mais favorável possível é o tipo de substrato utilizado, uma vez que a hidrólise e a metanogênese determinam a velocidade da digestão, podendo haver, no primeiro caso, limitações consideráveis se a estrutura do substrato for mais complexa, e a última etapa sendo facilitada se houver uma degradação mais completa desse material (PASSOS; ORTEGA; DONOSO-BRAVO, 2017).

A hidrólise, de acordo com Morgenroth, Kommedal e Harremoës (2002), primeira etapa do processo de digestão, consiste na degradação de compostos orgânicos mais complexos em compostos mais simples, por exemplo, carboidratos, proteínas e lipídeos em açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, por meio da atividade de muitos microrganismos hidrolíticos.

Nessa primeira etapa, considerada a etapa limitante do processo de DA, de acordo com Ghosh Ombregt e Pipyn (1985), os compostos complexos são degradados pela ação de hidrolases, enzimas extracelulares ligadas à parede celular, como celulase, protease e lipase, as quais são secretadas por microrganismos hidrolíticos facultativos, sendo os seguintes filos os mais comuns das principais bactérias envolvidas: Firmicutes, Actinobactérias, Bacteroides, Proteobacteria,. *Streptococcus* e *Enterobacter* são os gêneros primários responsáveis pela hidrólise, seguidos por *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Propionibacterium*, por exemplo (VENTORINO et al., 2018; XU et al., 2018; YADAV et al., 2022).

Na etapa acidogênica, fase sucessiva a hidrólise, as bactérias formadoras de ácidos conduzem o processo fermentativo para alcançar uma produção de AGV a partir da conversão dos produtos hidrolíticos, sendo principalmente recuperados ácidos (acético, propiônico, butírico, valérico) e álcoois, e normalmente é uma etapa de rápida cinética de conversão do substrato orgânico em subprodutos (YADAV et al., 2022). Na acidogênese, Bacteroidetes, Firmicutes e Clostridium são relatados como os filos mais representativos de bactérias

fermentativas que atuam durante o processo acidogênico, sendo os gêneros mais comuns *Ruminococcus*, *Paenibacillus* e *Clostridium* ativos nessa fase (SUN et al., 2015).

A fase acidogênica é crucial para decidir a via metabólica de conversão da biomassa. Cada tipo de AGV formado durante o processo segue uma via específica e proporciona diferentes condições e predominância microbiana para o desenvolvimento das etapas seguintes. A divisão em múltiplas rotas durante o processo acidogênico é um fator importante para a formação, assim como distribuição dos AGV (ZHOU et al., 2018).

A transição de matéria orgânica para ácidos orgânicos faz com que o pH do sistema diminua, condição benéfica para as bactérias acidogênicas e acetogênicas que preferem um ambiente levemente ácido. De acordo com Lee et al., (2014), diversos fatores são cruciais na eficiência da produção e qualidade dos ácidos. O pH, por exemplo, controla a produção dos ácidos durante a fermentação, e pode afetar a atividade dos microrganismos. Muitos estudos relataram faixas ideais para o processo fermentativo e produção de ácidos, entretanto, eles sempre destacaram a influência do tipo de substrato utilizado, mas no geral um pH em torno de 5,5 e 6,5 seria considerado ótimo para a produção de ácidos.

Na acetogênese, os ácidos gerados nas fases anteriores, hidrolítica e acidogênica, são convertidos, por meio de bactérias acetogênicas, para formar acetato, gás hidrogênio (H_2) e gás carbônico (CO_2). Nesta fase, dois grupos de bactérias conduzem o processo sintrófico de produção e degradação do acetato. As bactérias acetogênicas - grupo de formadores de acetato, que convertem o H_2 e o CO_2 em acetato. Por outro lado, as bactérias sintróficas oxidantes de acetato, microrganismos degradadores de acetato que o oxidam para convertê-lo em H_2 e CO_2 (WESTERHOLM; DIGESTION, 2019).

As bactérias acetogênicas são anaeróbias estritas, atuam em um pH ótimo em torno de 6,0, são isoladas principalmente de habitats anóxicos e utilizam a via da acetil coenzima A, que possuem enzimas extremamente sensíveis ao oxigênio (O_2). Elas possuem um crescimento lento, sensíveis a flutuações nas cargas orgânicas e mudanças ambientais (WOOD; LJUNGDAHL, 1991).

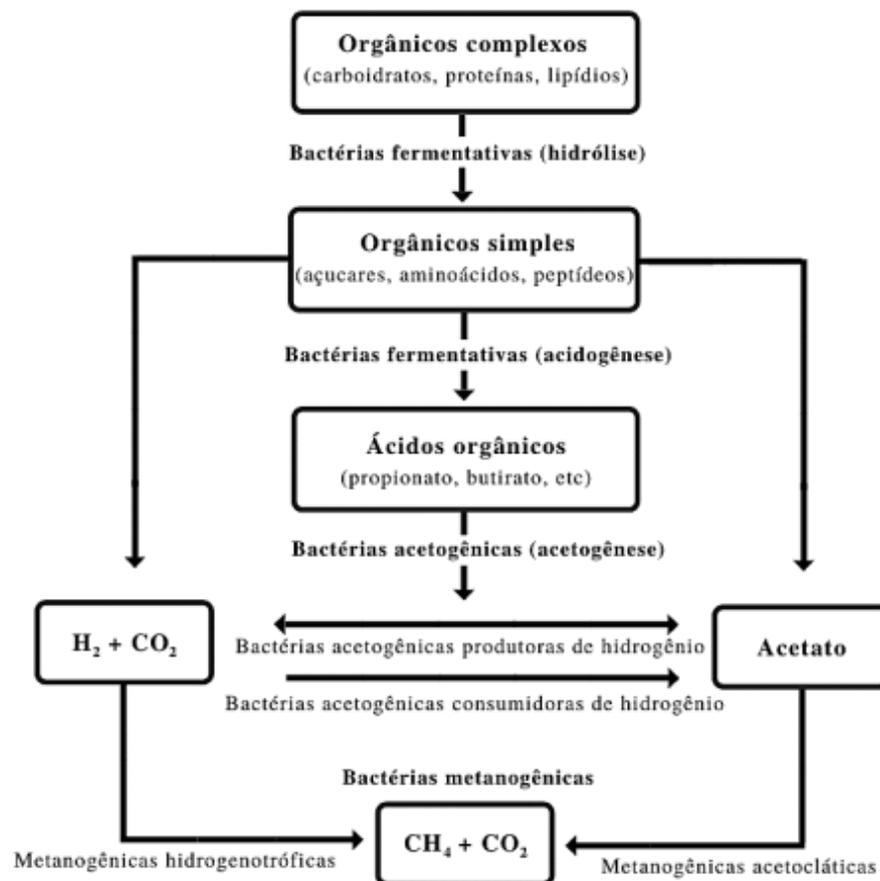
A metanogênese é a etapa que possibilita a conversão dos produtos oriundos da acetogênese em metano por meio da atividade de *archaeas* metanogênicas, as quais podem fazer parte de dois grupos distintos os metanogênicos hidrogenotróficos, que formam o metano a partir da oxidação do H_2 e do CO_2 , ou das acetoclásticas, que diferentemente utilizam o acetato para a formação de metano, sendo as *Methanosaetas* e as *Methanosarcinas* as *archaeas* acetoclásticas mais observadas no processo da digestão anaeróbia (KONG et al., 2019; YADAV et al., 2022).

A metanogênese hidrogenotrófica é a via metabólica mais comum onde CO_2 e H_2 são convertidos em metano. Além do hidrogênio, a maioria dos metanogênicos hidrogenotróficos também utilizam o formato como o principal doador de elétrons. Na metanogênese acetoclástica, o acetato é diretamente convertido em metano. O grupo carboxila do acetato é oxidado a CO_2 pelo qual o grupo metil é reduzido a metano (GARRITY et al., 2007).

A metanogênicas hidrogenotróficas são mais resistentes às mudanças ambientais do que as metanogênicas acetoclásticas. São microrganismos muito sensíveis a mudanças e preferem ambientes levemente alcalinos, se o pH for inferior a 6,0, o processo pode ser inibido, ou seja, a metanogênese é a etapa controladora da taxa do processo anaeróbico (MERLIN CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014).

A Figura 1 traz, resumidamente, uma esquematização das rotas metabólicas do processo de DA.

Figura 1 - Resumo das rotas metabólicas da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Mosey (1982).

O processo possui uma grande viabilidade de produção de biogás, o qual consiste em 50 a 70% de gás metano (CH_4), 25-40% de CO_2 e 1-5% de outros gases, incluindo nitrogênio,

hidrogênio, sulfeto de hidrogênio, amônia e vapor de água, tornando essa tecnologia uma fonte de energia renovável (ATELGE et al., 2020).

A DA ocorre em condições estritamente controladas no intuito de promover o melhor desempenho dos reatores, aperfeiçoando as atividades metabólicas dos diversos grupos microbianos existentes que convertem o resíduo orgânico em biogás. Dessa forma, para que bactérias hidrolíticas, bactérias acidificantes e *archaeas* metanogênicas possam atuar de maneira sintrófica, é necessário observar fatores importantes que podem impactar negativamente o desempenho metabólico e a produção de biogás no processo (ZHANG; LOH; ZHANG, 2019).

Uma alternativa para o melhor desempenho da DA seria a adoção de um sistema de dois estágios, onde as reações bioquímicas podem ser otimizadas independentemente, com o objetivo de atender às comunidades microbianas hidrolíticas e metanogênicas (GHOSH; OMBREGT; PIPYN, 1985).

3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O PROCESSO ANAERÓBIO

O pH, a temperatura, a matéria orgânica, o nitrogênio, a relação carbono/nitrogênio (C/N) as configurações do reator, a carga orgânica volumétrica (COV) aplicada e tempo de detenção hidráulica (TDH) são fatores cruciais para o desenvolvimento favorável dos processos anaeróbios (MERLIN CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014).

O pH e a temperatura influenciam diretamente a DA por afetarem os microrganismos que atuam no processo. Durante a decomposição dos substratos há formação dos ácidos e tendência a diminuição do pH, o que é objetivado em reatores fermentadores em sistemas de dois estágios (reator fermentador separado de reator metanogênico). Entretanto, quando utilizados sistemas de estágio único, um acúmulo de AGV e diminuição do pH podem inibir o processo de metanogênese, tendo em vista que *archaeas* metanogênicas são bastante sensíveis às variações e adaptam-se melhor em ambiente com pH entre 6,5 e 8,0 (ZHANG; LOH; ZHANG, 2019).

A temperatura, assim como o pH, possui grande importância para um desenvolvimento favorável dos processos anaeróbios, podendo afetar diretamente a atividade enzimática, a velocidade de crescimento e o metabolismo dos microrganismos (ZHANG; LOH; ZHANG, 2019). Os microrganismos são capazes de crescerem e adaptarem-se em três faixas de temperatura diferentes: a faixa psicrófila, entre 4 e 15°C, a faixa mesófila, idealmente entre 20 e 40°C e a faixa termófila situada acima de 45°C (METCALF; EDDY, 2014).

A temperatura operacional muito baixa pode reduzir a eficiência catalítica enzimática ideal para o processo, assim como a temperatura muito alta também pode influenciar negativamente, desnaturando enzimas sensíveis e proporcionando uma falha no sistema (ZHANG; LOH; ZHANG, 2019).

Em termos de disponibilidade de nutrientes no sistema, um fator de grande importância a ser considerado e que pode influenciar a produção de biogás é a relação carbono/nitrogênio (C/N), que possui valores de referência para um melhor desenvolvimento da DA, geralmente entre 20 e 30. Alguns substratos tendem a possuir valores considerados muito baixos, menor do que 15, tendendo ao acúmulo de amônia, causando inibição da metanogênese e, conseqüentemente, a diminuição do rendimento na produção de metano (RODRIGUEZ et al., 2018; XIAO et al., 2022).

Com relação às características dos resíduos, são levados em consideração fatores como concentração de matéria orgânica do substrato e tamanho das partículas. Em relação ao tamanho das partículas, a DA é beneficiada pois quanto menor a área superficial do substrato mais favorece a ação das enzimas, influenciando positivamente a biodegradação dos resíduos e a estabilidade da DA, conseqüentemente, a produção de biogás (ZHANG; BANKS, 2013).

A carga orgânica volumétrica (COV) refere-se à quantidade de matéria orgânica aplicada ao digestor anaeróbio na unidade de tempo e por volume do reator, sendo um parâmetro importante para proporcionar uma atividade ótima aos microrganismos, uma vez que a aplicação de grandes quantidades de materiais orgânicos no sistema pode ocasionar um processo de inibição da metanogênese, principalmente em sistemas de estágio único (NESHAT et al., 2017).

LI et al. (2017) ao estudarem os efeitos de diferentes cargas orgânicas no processo de codigestão, relataram que COV abaixo de $2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ e acima de $15 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ podem ocasionar ineficiência do sistema. Quando há o aumento da carga dentro de um reator, apesar de serem observadas vantagens, verifica-se que pode haver maior acúmulo de AGV e alcoóis, má transferência de calor e distribuição desigual durante a agitação. Entretanto, para os sistemas de dois estágios, alcançar quantidades altas de produção de AGV (acima de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) é uma grande vantagem, além do fato de não apresentar inibições à metagênese tendo em vista à presença de uma comunidade microbiana adaptada a essas condições de altas concentrações de AGV e baixo pH, em torno de 5,0 e 6,0, e que não há o objetivo de produção de metano no reator acidogênico (CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012; NAGAO et al., 2012).

Em outros estudos desenvolvidos para avaliar também o efeito da COV, Paudel et al. (2017) relataram que há faixas que são consideradas ideais para a produção de metano e

remoção orgânica em sistemas de dois estágios, sob agitação contínua e condições mesofílicas (37°C), como 3,7 a 12,9 kg SV m⁻³·d⁻¹.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) é outro parâmetro de grande importância que deve ser levado em consideração, sendo definido como tempo de permanência do substrato no reator. Este, pode ser expresso em horas ou dias, e está associado à taxa de crescimento microbiano, à temperatura do processo, à COV e à composição do substrato (MAO et al., 2015).

O TDH é um fator essencial para a atividade metabólica dos microrganismos em digestores anaeróbios, e deve ser otimizado para os substratos específicos que são fornecidos ao digestor. Um tempo médio de 15 a 30 dias é necessário para degradar resíduos em condições mesofílicas. Geralmente, diminuir o TDH pode levar ao acúmulo de AGV, uma vez que considerando a menor taxa de crescimento de microrganismos metanogênicos em comparação às bactérias acidogênicas, o controle do TDH pode ser realizado a fim de forçar uma lavagem de metanogênicos acetoclásticos do reator, permitindo a seleção de comunidades microbianas mais adequadas ao acúmulo de AGV. Enquanto um TDH mais longo do que o ideal pode proporcionar em uma utilização insuficiente da comunidade microbiana do digestor (MAO et al., 2015; ZHANG; LOH; ZHANG, 2019).

Em geral, para DA de biomassa de algas, um TDH abaixo de 10 dias resulta em uma baixa produção de metano, e para resíduos de alimentos, por exemplo, a estabilidade do processo diminuiu em um TDH maior, de 8 dias. Ou seja, no geral, quando há o objetivo de alcançar rendimentos máximos e constantes de metano, é necessário operar o sistema com carga orgânica mais baixa e tempo de detenção mais representando um reator superdimensionado (KIM et al., 2006; KWIETNIEWSKA; TYS, 2014).

3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL

3.4.1 Microalgas

A crise energética, a escassez de água e a poluição ambiental desencadearam uma crescente busca por investigar a utilização de microalgas para mitigação dessas problemáticas e, além disso, proporcionar recuperação de subprodutos de valor agregado. Nas estações de tratamento de esgoto (ETE) elas podem ser utilizadas no pós-tratamento de esgotos e, conseqüentemente, produzir biomassa excedente com grande potencial energético (GUPTA; 2016; SOLÉ-BUNDÓ et al., 2019).

O tratamento biológico que envolve microalgas apresenta vantagens quando comparadas com as estações de tratamento convencionais, devido à capacidade que as algas possuem em assimilar nutrientes como, carbono, nitrogênio e fósforo em associação com o CO₂, produzindo O₂ e biomassa através da fotossíntese. Adicionalmente, proporciona uma redução da necessidade de utilização de energia pelo consumo de oxigênio por bactérias heterotróficas para remoção de carbono, além de possuírem capacidade de remover metais pesados e outros compostos orgânicos tóxicos (GUPTA, 2016).

As microalgas são microrganismos unicelulares, constituídos de fitoplâncton, possuem estrutura multicelular simples, são fotossintéticos, ou seja, capazes de converter energia solar em energia química sob a forma de biomassa e através da absorção de CO₂ produzem matéria orgânica e liberam oxigênio (CHISTI, 2007; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Por apresentarem uma composição rica em carboidratos, proteínas e lipídeos, as microalgas passaram a ser consideradas uma alternativa mais econômica e ambiental para obtenção de energia. Esses organismos possuem composições que são bastante específicas de cada tipo de espécie, e podem obter proporções de proteínas (6–52%), lipídios (7–23%) e carboidratos (5–23%) (BROWN et al., 1997). A alta proporção de proteínas, que podem ser apresentadas em diversas espécies, é caracterizada por um baixo C/N especialmente se comparado com plantas terrestres.

Variações nesta composição celular podem afetar o desempenho da digestão anaeróbica. Por exemplo, em termos de potencial teórico de metano, quanto maior o conteúdo lipídico da célula, maior o rendimento de metano. O alto teor energético dos lipídios os torna atraentes para a digestão anaeróbica devido ao seu maior potencial de produção de gás em comparação com carboidratos e proteínas (CIRNE et al., 2007; LI; KHOR, 2002).

Angelidaki e Sanders, (2004) relataram rendimentos de 0,851, 1,014 e 0,415 L CH₄ g·SV⁻¹ para proteínas, lipídios e carboidratos, respectivamente, e foram utilizados como estimativas para diversas biomassas de microalgas estudadas (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

As biorrefinarias de microalgas combinam a produção de biocombustíveis e produtos de alto valor, o que tem atraído bastante atenção tanto para o desenvolvimento de novos estudos, quanto para os processos industriais (CHEW et al., 2017).

Oswald e Golueke, (1960) foram os primeiros a investigar a digestão de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* cultivadas em águas residuais. Logo em seguida, os mesmos autores propuseram integrar o processo de DA à produção de microalgas em lagoas abertas para o tratamento de águas residuais e recuperação de metano.

Entre as vantagens da utilização das microalgas para a produção de biocombustíveis, pode-se citar: possibilidade de cultivo da biomassa durante todo o ano; favorável crescimento em meio aquoso, inclusive em águas salobras; rápido crescimento; alta biofixação de emissões de CO₂ (1kg de biomassa seca de algas utiliza cerca de 1,83 kg de CO₂); seu cultivo não necessita da aplicação de herbicidas ou pesticidas (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Apesar das microalgas apresentarem um grande potencial para a produção de bioenergia, a sua utilização ainda evidencia algumas limitações a serem superadas antes de se tornar um substrato convencional para os processos industriais, capaz de conseguir produzir uma quantidade de energia necessária para balancear suas limitações (WARD; LEWIS; GREEN, 2014).

3.4.2 Limitações da utilização de biomassa algal

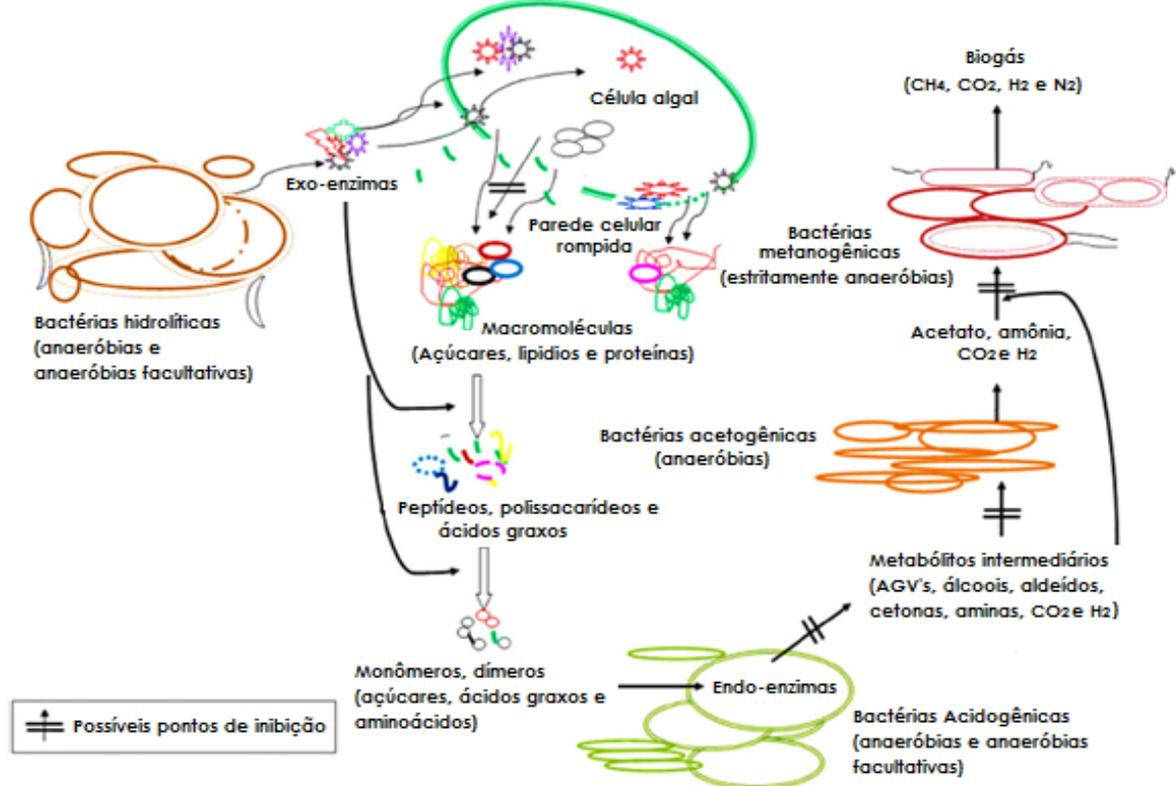
Apesar da composição macromolecular da biomassa algal ser uma característica essencial para tornar esse resíduo uma alternativa com grande potencial para a produção de energia, como o biogás, a natureza da parede celular é reconhecida por sua resistência à cinética da DA (TIJANI; ABDULLAH; YUZIR, 2015). Apesar da baixa biodegradabilidade da parede celular das microalgas ser um dos principais fatores que determina a eficiência do processo de DA, poucas informações acerca da composição da parede celular estão disponíveis para a maioria das espécies (GANESH SARATALE et al., 2018).

De maneira geral, as paredes celulares das algas são compostas por dois componentes: o componente fibrilar, que forma o esqueleto da parede, e o componente amorfo, que forma uma matriz dentro da qual o componente fibrilar está submerso (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). Os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, possuem paredes celulares mais complexas, sendo compostas de uma camada superficial, que pode ser homogênea ou possuir um revestimento trilaminar, camada esta resistente à degradação anaeróbia, uma vez que é composta de esporopolenina, também chamada de *algaenan*, biopolímero semelhante à lignina, formado de ácidos graxos hidroxilados e fenólicos (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014).

Com relação às características da parede celular, ela é composta em sua maioria por compostos orgânicos com baixa biodegradabilidade, como a celulose e a hemicelulose. A rígida parede celular dificulta a produção de metano, pois a matéria orgânica retida no citoplasma não é facilmente acessível às bactérias anaeróbicas, dificultando o processo de hidrólise, como demonstrado na Figura 2, a qual possibilita a visualização de possíveis pontos de inibição da DA. Estudos pioneiros sobre DA de biomassa algal já mencionavam células recalcitrantes com

relutância ao processo de hidrólise, dificultando a sua degradação, que mesmo após um TDH de 30 dias as células continuavam intactas (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957).

Figura 2 - Representação esquemática da digestão anaeróbia de biomassa de algas com os possíveis pontos de inibição



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

Em relação ao rompimento celular da biomassa algal, por apresentarem alto conteúdo protéico, das células de microalgas resulta a liberação de compostos nitrogenados ao meio, entre eles a amônia na forma ionizada (NH_4^+). O excesso deste íon no meio reacional pode resultar em aumento da concentração da amônia livre (NH_3) a qual apresenta potencial de toxicidade e inibição do metabolismo bacteriano. Essa instabilidade de amônia pode influenciar no acúmulo de ácidos no meio, provocando uma redução do pH e diminuição da concentração de amônia. Essa interação, apesar de voltar a proporcionar uma condição mais estável ao sistema, pode proporcionar uma redução de rendimento de metano (ANGELIDAKI; AHRING, 1993; SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

De acordo com Koster e Lettinga, (1984) entre os microrganismos anaeróbios, as *archaea* metanogênicas acetoclásticas possuem uma maior sensibilidade ao acúmulo de amônia em uma faixa relativamente variável (entre 1,7 e 14 g/L). Além disso, fatores como período de aclimação, natureza do substrato e inóculo, temperatura e condições operacionais, estão

extremamente interligados ao aumento das concentrações de amônia, e, portanto, à estabilidade do processo (ANGELIDAKI; AHRING, 1993).

Outro desafio que é bastante relatado nos estudos acerca da utilização de biomassa algal é a baixa relação C/N, isto é, abaixo de 15. A faixa ideal para o processo de digestão anaeróbia é entre 15 e 30, que quando não alcançada, pode ocasionar toxicidade por amônia às metanogênicas (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Dessa forma, diversos estudos orientam a utilização de cosubstratos ricos em carbono para proporcionar o aumento de C/N no meio, assim como o uso de pré-tratamentos da biomassa para favorecer o processo biológico (YEN; BRUNE, 2007; WEILAND, 2010).

3.5 MECANISMOS PARA OTIMIZAR O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

3.5.1 Codigestão anaeróbia

A biodegradação de mais de um substrato em um processo anaeróbio é denominada de codigestão, sendo considerada uma alternativa para as limitações encontradas na digestão anaeróbia, dependendo dos substratos a digerir. Essa técnica pode possibilitar melhores condições de equilíbrio de nutrientes, assim como um melhor desempenho microbiano, e conseqüentemente, promover um aumento do rendimento de metano, além dos benefícios econômicos em tratar mais de um resíduo simultaneamente, o que condiz ser favorável ao alcance da economia circular (WAINAINA et al., 2020).

Diversas pesquisas foram desenvolvidas a fim de executar a combinação de diferentes resíduos, em diferentes proporções e condições operacionais, com o intuito de melhorar o desempenho dos processos e a eficiência da produção de metano. Com relação às microalgas, por apresentarem uma baixa relação C/N, a adição de um cosubstrato rico em carbono pode facilitar o processo de degradação e conversão em metano (SOLÉ-BUNDÓ et al., 2019a).

Yen e Brune (2007) observaram um aumento de 143 para 292,5 mL CH₄·g SV⁻¹_{ad} quando foram adicionados resíduos de papel à biomassa algal. Os autores conseguiram elevar a relação C/N de 6,7 para 18.

De acordo com Thorin et al. (2018) e Solé-Bundó et al. (2019a) foi observada sinergia e incremento de 25% na produção de metano quando microalgas foram codigeridas com lodo de esgoto. Além disso, os autores relataram estabilidade e melhoria na cinética de degradação da etapa de hidrólise, sendo considerada a etapa limitante do processo de digestão anaeróbia.

No Brasil, um substrato de grande interesse no processo biotecnológico anaeróbio é a vinhaça de cana-de-açúcar. Avanços tecnológicos na indústria sucroalcooleira possibilitaram o crescimento do setor, tornando o país referência mundial na produção de etanol à base de cana-de-açúcar (COELHO et al., 2006; MOREIRA, 2000).

A vinhaça, principal resíduo líquido da etapa de destilação do processo produtivo do etanol a partir do processamento da cana-de-açúcar, apresenta um elevado teor de matéria orgânica, podendo ser 100 vezes maior que o esgoto doméstico, assim como altas concentrações de potássio e sulfato, e características ácidas e corrosivas (FUESS; GARCIA, 2014). No processo produtivo do etanol, é necessário realizar uma correção do pH, com adição de ácido sulfúrico, para prevenção da floculação de leveduras, o que resulta em uma característica ácida do efluente, com variações de pH entre 3,5 e 5,0, além de ser o principal responsável pelas altas concentrações de sulfato (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

O processo produtivo de etanol gera grandes volumes de vinhaça. Estimou-se, nos anos de 2017/2018, cerca de 340 bilhões de litros de vinhaça como resíduo da produção de quase 28 bilhões de litros de etanol produzido, uma estimativa de quase 13 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido (CONAB, 2020).

O alto teor orgânico biodegradável da vinhaça, juntamente com alto teor da relação C/N, aproximadamente 60, possibilita tornar esse efluente um subproduto como alternativa valiosa na aplicação dos processos de digestão anaeróbia, visando à produção de compostos de valor agregado, como o biogás rico em metano (ENG SÁNCHEZ et al., 2021). Além disso, a aplicação da DA para o tratamento da vinhaça torna-se ainda mais atrativo devido à redução de carga orgânica, baixo custo de operação e possibilidade da aplicação de um composto digerido como biofertilizante nas áreas agrícolas, associando o conceito de biorrefinaria ao setor sucroalcooleiro (FUESS; GARCIA, 2014; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

De acordo com Szymanski et al. (2010), o biogás produzido pelos processos anaeróbios de degradação da vinhaça poderia ser utilizado na indústria sucroalcooleira, a fim de substituir parte dos combustíveis utilizados, assim como fornecer energia às caldeiras para geração de vapores e moagem da cana-de-açúcar.

3.5.2 Sistema de dois estágios

O processo de DA pode ser dividido, do ponto de vista metabólico, em duas principais rotas, a primeira sendo representada por um metabolismo de fermentação acidogênica, e a segunda representada por uma via acetogênica e metanogênica (MICOLUCCI et al., 2020).

Uma importante vantagem associada ao sistema de dois estágios é a possibilidade de controlar o processo em cada uma das fases metabólicas, com grupos microbianos específicos para cada um deles, com diferentes necessidades nutricionais e sensibilidade aos fatores ambientais, especialmente pH, temperatura e amônia. É de extrema importância manter os parâmetros estáveis de cada processo para que os objetivos sejam alcançados sem que haja impactos negativos que impeçam o alcance dos subprodutos desejados (VALENTINO et al., 2021).

Entre as condições ambientais controláveis, o pH, para o reator fermentador deve variar entre 5,0 e 6,0 para promover a atividade fermentativa (acúmulo de AGV) e para evitar o crescimento e proliferação das *archaeas* metanogênicas (consumo de AGV) (GOTTARDO et al., 2017; MICOLUCCI et al., 2020). Enquanto para o reator metanogênico, há um favorecimento e estabilidade do processo quando o pH se matem em torno de 6,5 e 8,0 (ANGELIDAKI; SANDERS, 2004).

Tendo em vista que Ghosh, Ombregt e Pipyn (1985) observaram a hidrólise como etapa limitante do processo de DA, o sistema de dois estágios foi considerado uma opção valiosa para melhorar a cinética e estabilidade dos sistemas. Essa separação das fases permite que os reatores sejam trabalhados de maneiras distintas, provocando um aumento de carga orgânica e uma redução do tempo de detenção hidráulica para o primeiro estágio, o que favorece uma melhoria do desempenho dos reatores (CHENG et al., 2016).

Em termos comparativos, estudos desenvolvidos com sistemas de estágio único e de dois estágios, aplicando condições operacionais equivalentes, mostraram concentrações médias de metano de 55% e 68%, respectivamente. Alguns estudos verificaram maior sucesso ao sistema de dois estágios devido a vantagens como uma maior eficiência de conversão de AGV em metano no segundo estágio (SCHIEVANO et al., 2014).

De maneira similar, Pakarinen, Tähti e Rintala (2009) observaram uma grande vantagem na aplicação do sistema de dois estágios, os resultados mostraram que um maior rendimento de CH_4 foi obtido a partir do processo de dois estágios ($467 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SV}^{-1}_{\text{ad}}$) em comparação com o processo de estágio único ($431 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g SV}^{-1}_{\text{ad}}$), além de uma maior solubilização da matéria orgânica e maior rendimento de AGV por meio da fermentação, permitindo a maior produtividade na fase metanogênica, tendo em vista que o ácido acético foi o mais abundante entre todos os ácidos detectados.

A partir desse processo combinado, surge a possibilidade de produzir subprodutos com características diferentes, havendo primeiramente, uma possibilidade de alcançar AGV e hidrogênio da etapa fermentativa, e metano e CO_2 , a partir do segundo processo, dividindo essas

rotas em diferentes configurações de reatores (MICOLUCCI et al., 2020; VALENTINO et al., 2021).

3.5.3 Pré-tratamentos

As tecnologias empregadas para utilizar biomassa de algas como fonte de biocombustível, são muito promissoras. A DA pode ser econômica para a produção de metano a partir da biomassa de algas, assim como pode ser combinada à produção de biodiesel, utilizando a biomassa que passou por processo de extração de lipídeos. Caso não haja a valorização, a biomassa de algas é considerada apenas como um resíduo ou subproduto de baixo valor (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014).

A disponibilidade de matéria orgânica para os microrganismos é um fator que influencia a eficiência da DA, tendo em vista que a baixa biodegradabilidade e o tamanho grande das partículas, são fatores importantes para o desempenho metabólico e podem influenciar no rendimento de produção de metano (THORIN et al., 2018).

Dessa forma, os pré-tratamentos podem contribuir para aumentar a biodegradabilidade dos substratos e, conseqüentemente, a produção de biogás (WANG et al., 2013). Com relação a biomassa algal, muitos estudos comprovaram a sua relevância devido à capacidade de hidrólise da parede celular, tornando-a mais biodegradável e, conseqüentemente, aumentando o rendimento de biogás (AJEEJ et al., 2015; AYALA-PARRA et al., 2017; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Diversas tecnologias de pré-tratamentos vêm sendo estudadas para promover maior solubilização dos compostos orgânicos. Entre essas tecnologias estudadas há os pré-tratamentos térmicos, mecânicos, químicos e biológicos (SOLÉ-BUNDÓ et al., 2018).

Os pré-tratamentos térmicos são os caracterizados por proporcionar solubilização da biomassa algal por meio da aplicação de calor, podendo ser conduzidos em temperaturas de 50 a 270° C, faixa ideal para o processo, mas dependente das características do substrato em estudo (CARRÈRE et al., 2010).

Os pré-tratamentos térmicos são subdivididos em três categorias: pré-tratamento térmico, pré-tratamento hidrotérmico e pré-tratamento térmico com explosão de vapor. O pré-tratamento térmico incide no aquecimento da biomassa a temperaturas abaixo de 100° C sob pressão atmosférica. O hidrotérmico consiste na aplicação de calor a temperaturas superiores a 100° C e com liberação gradual de pressão após o pré-tratamento. E o térmico com explosão

de vapor consiste em uma queda brusca de pressão após o pré-tratamento em temperaturas acima de 100° C (PASSOS et al., 2014).

Com relação às vantagens e desvantagens acerca dos tratamentos térmicos, apesar de possibilitarem capacidade em aumentar a solubilização das frações orgânicas e ter potencial de aplicação em larga escala, podem demandar um alto consumo energético e não apresentar um balanço energético positivo, tornando o método economicamente inviável (AYDIN et al., 2017).

O desempenho do pré-tratamento térmico pode ser influenciado pela temperatura e pelo tempo de exposição do substrato àquele método, dessa forma, é mencionado que a temperatura é o fator que mais influência na desintegração e biodegradabilidade anaeróbia da biomassa desde o surgimento dos primeiros estudos acerca do pré-tratamento térmico (CHEN; OSWALD, 1998)

Schwede et al. (2013) reportaram um aumento de 108% no rendimento de metano ao utilizar *Nannochloropsis salina*, a partir da fermentação da biomassa em um reator de mistura contínua (CSTR), mediante a aplicação prévia de calor a 120° C durante 2h à biomassa de microalgas.

Além do pré-tratamento térmico, técnicas de pré-tratamento mecânico também podem ser utilizadas para a solubilização de células de microalgas, uma vez que esse mecanismo proporciona uma força física sobre as moléculas das células promovendo a ruptura da parede celular. De acordo com (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2012) os pré-tratamentos mecânicos são frequentemente utilizados anterior ao processo de extração de lipídios para a produção de biodiesel, tendo em vista que apresentam menor dependência de espécies de microalgas e baixa predisposição à contaminação, quando comparados com outros tipos de pré-tratamento. Com relação ao potencial de produção de biogás, incluindo o gás metano, as metodologias mais disseminadas são ultrassom e micro-ondas.

Para o pré-tratamento químico, reagentes ácidos e alcalinos são frequentemente usados para solubilizar polímeros, favorecendo a disponibilidade de compostos orgânicos para as atividades enzimáticas. Esse método tem sido menos frequente do que o térmico e mecânico, e entre os processos químicos, estão sendo utilizados principalmente pré-tratamentos alcalinos aplicados a microalgas e muitas vezes combinados com calor. Entretanto, os custos operacionais com produtos químicos são limitantes para o escalonamento do pré-tratamento químico de biomassa de algas. (PASSOS et al., 2014).

De modo diferente dos demais, o método de pré-tratamento biológico é fundamentado em 3 âmbitos: fúngico, bacteriano e enzimático e estão recebendo grande destaque devido à baixa demanda de energia inicial para promover a hidrólise do substrato.

No âmbito do pré-tratamento fúngico, diferentes espécies de fungos podem ser utilizadas para degradar constituintes da parede celular algal como lignina, celulose e hemicelulose, por meio da liberação de enzimas específicas. Por outro lado, apresenta-se o pré-tratamento microbiano, também conhecido como pré-acidificação, baseado na realização das etapas de hidrólise e acidogênese de maneira desagregada às etapas de acetogênese e metanogênese, realizados em sistemas de dois estágios. Essa separação de fases previne efeitos inibitórios à metanogênese, como o acúmulo de ácidos e um ambiente com baixo pH (AGBOR et al., 2011; BOHUTSKYI; BOUWER, 2012; KUMAR; WYMAN, 2009).

O método de pré-tratamento biológico enzimático consiste na adição de diferentes tipos de enzimas, auxiliando as reações de desintegração da parede celular das microalgas. Esse método não gera compostos recalcitrantes e pode ser ofertado com baixos consumos de energia, porém é um processo lento que pode apresentar altos custos (PRAJAPATI et al., 2013).

Além dos anteriores, há os pré-tratamentos enzimáticos, que podem ser realizados com consórcios microbianos hidrolíticos, como os encontrados nos sistemas digestivos de ruminantes, que podem estar associados a bactérias que são capazes degradar pectina (BARRAGÁN-TRINIDAD; CARRILLO-REYES; BUITRÓN, 2017). E, outro método de pré-tratamento enzimático é através da atividade de enzimas celulolíticas endógenas produzidas por fungos (MARTINS, 2019).

3.6 RECUPERAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE VALOR AGREGADO

3.6.1 Biogás

A DA é uma tecnologia de processos biológicos adequada para alcançar uma série de vantagens com a utilização dos resíduos, como a recuperação de energia e nutrientes, como mencionando anteriormente. Wainaina et al. (2020) relataram em seu estudo sobre recuperação de recursos usando tecnologias de DA que, em termos energéticos, há indícios que o alcance de biogás pelo processo anaeróbio está em constante crescimento.

O biogás bruto pode ser utilizado para aquecimento e/ou produção de eletricidade, por meio de caldeiras e motores ou turbinas a gás. Parte do gás produzido é utilizado para o aquecimento do digestor, e como a produção de calor e eletricidade geralmente é realizada no

local da usina de biogás, não há necessidade de uma grande infraestrutura para tal produção (RYCKEBOSCH; DROUILLON; VERVAEREN, 2011).

Em termos de composição química, sabe-se que o metano pode representar cerca de 50 a 65% do biogás, e pode ser aplicado energeticamente em redes de gás natural ou ser usado como combustível para veículos, uma medida que possui grande potencial de ajudar na redução de GEE, principalmente relacionadas ao transporte rodoviário (OLSSON; FALLDE, 2015).

De acordo com Kapoor et al., (2019) quando há o objetivo de uso como combustível veicular ou injeção em uma rede de gás natural, tecnologia e infraestrutura adicionais são necessárias, primeiramente, um tratamento extra para remoção de CO₂ e outras impurezas, que podem ser problemáticas para a estrutura mecânica e elétrica dos transportes. Para isso, técnicas como depuração de água, adsorção por oscilação de pressão, separação por membrana, entre outras, são utilizadas para promover a seleção do metano e aumentar o poder calorífico do gás.

Além do grande interesse em sua utilização para o setor de transportes, algumas indústrias tornaram o biogás um produto importante e não apenas uma consequência do tratamento anaeróbio. Na Suécia, o biogás passou a ser usado como fonte de aquecimento em processos internos da fabricação de celulose, por exemplo, e seu excedente é vendido para usinas de cogeração (OLSSON; FALLDE, 2015).

3.6.2 Ácidos graxos voláteis

Os AGV são as substâncias intermediárias de extrema importância para o desenvolvimento do processo de digestão anaeróbia sendo produzidos por bactérias hidrolíticas e fermentativas. Eles são formados nas primeiras etapas da DA e estudos são desenvolvidos com ênfase principalmente nos ácidos que possuem dois a seis carbonos em sua composição (LEE et al., 2010; KIM et al., 2011).

Esses ácidos de dois a seis carbonos são gerados após a hidrólise e acidogênese na chamada fermentação anaeróbia. Os ácidos acético, butírico e propiônico são os principais produtos da fermentação e são indicadores que podem ser usados para avaliar o desempenho e estabilidade do processo (NESHAT et al., 2017).

Os ácidos formados a partir do processo de fermentação podem ser valiosos para a indústria química, os quais podem ser utilizados como um só produto ou podem servir como precursores de vários bioprodutos (álcoois, aldeídos, cetonas, carboxilatos de cadeia alongada a média), além das demais aplicações em diferentes campos, como a produção de solventes, adesivos, aditivos alimentares, cosméticos e indústrias farmacêuticas (LLAMAS et al., 2021).

Strazzera et al. (2018) desenvolveram um estudo de revisão acerca da produção dos AGV a partir de resíduos alimentares. Com o objetivo de fornecer uma visão sobre os melhores pré-tratamentos e condições para maximizar a sua produção, foi evidenciado que os resíduos que possuem alto teor de matéria orgânica, assim como concentrações de nitrogênio e fósforo, são mais adequados para a produção de ácidos. Além disso, condições controladas que são consideradas importantes tais como o pH, TDH curto e temperaturas termofílicas, permitem um aumento da concentração de AGV em torno de 10 a 25%.

A biomassa de algal pode ser considerada uma matéria-prima atraente de baixo custo para a produção de AGV, tendo em vista a sua composição rica em proteínas, considerada uma característica vantajosa quando há um direcionamento de produção de ácidos (MAGDALENA; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2020). Durante a degradação da biomassa algal, o nitrogênio é liberado na forma de amônio (NH_4^+) e amônia livre (NH_3), as altas concentrações desses compostos podem inibir a comunidade microbiana metanogênica que consome AGV para produção de biogás, promovendo, dessa forma, o acúmulo dos ácidos (TIAN et al., 2018).

Uma alternativa para aumentar a produção de biogás pode ser o uso da estratégia de digestão anaeróbia em dois estágios. Essa configuração permite a segregação do processo de digestão em dois reatores, o que possibilita implementar condições ambientais favoráveis para cada grupo microbiano, beneficiando o controle do processo e maximizando os rendimentos da produção de AGV (SCHIEVANO et al., 2014).

De acordo com Bolzonella (2005) algumas condições operacionais são preferenciais para o desenvolvimento do processo de formação dos AGV, como uma faixa termofílica de temperatura, pH controlado em torno de 6,0 e 7,0 (dependendo do substrato) e TDH mais curtos, em torno de 1 e 10 dias. Dessa forma, conhecendo tais condições que podem favorecer o processo de produção de AGV, foi relatado que essas condições favorecem a via metabólica glicolítica, permitindo a produção de ácido acético e inibindo a metanogênese. Entretanto, de maneira contrária, quando o pH se encontra em uma faixa entre 7,0 e 8,0, de acordo com Baumann e Westermann (2016), pode haver uma predominância da atividade de microrganismos metanogênicos, possibilitando a produção de metano a partir dos ácidos formados.

Os AGV são extremamente úteis para a indústria devido aos seus grupos funcionais como os ácidos carboxílicos e, além disso, são conhecidos como substratos para a produção de metano e hidrogênio, assim como os polihidroxialcanoatos (PHAs), biopolímeros biodegradáveis que estão sendo bastante utilizados atualmente e que podem ser sintetizados por microrganismos acumuladores de AGV (LEE et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, Pernambuco, Brasil. A pesquisa foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foram realizados experimentos em escala laboratorial através da avaliação do potencial bioquímico de metano (PBM), utilizando os substratos biomassa algal e vinhaça de cana-de-açúcar. Posteriormente, os substratos foram utilizados em reatores semicontínuos de dois estágios, um para as fases de hidrólise e acidogênese, seguido de um segundo reator para as etapas de acetogênese e metanogênese. O esquema representativo das etapas desenvolvidas neste trabalho pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema das etapas metodológicas



Fonte: A autora (2022).

4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO E SUBSTRATOS

4.1.1 Inóculo

Um lodo anaeróbio foi utilizado como inóculo para todos os experimentos realizados. O inóculo foi oriundo de um reator anaeróbio operado sob condições mesofílicas (37° C), tratando águas residuais de uma indústria de produção de cerveja, localizada no município de Itapissuma, Pernambuco.

Foi realizada a elutriação do lodo após a sua coleta, a fim de proporcionar uma separação do material inerte e biomassa inativa (ou baixa atividade). Após esta etapa, o lodo foi incubado em sala termostatizada (30° C), para dar condições à produção de metano endógeno.

A caracterização do inóculo foi realizada com relação ao seu potencial hidrogeniônico (pH), concentração de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), alcalinidade total e parcial, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

4.1.2 Substratos

4.1.2.1 Biomassa algal

A biomassa algal utilizada nos experimentos foi proveniente de uma lagoa em escala piloto, de alta taxa (LAT) (Figura 4). A LAT está sendo utilizada para pós-tratamento de esgoto sanitário de um reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), localizada na ETE Mangueira, no município de Recife, Pernambuco. Foram realizadas duas coletas. Para ambas as coletas, foi utilizada uma peneira de aço inoxidável com diâmetro 0,250 mm e um cone *Imhoff* para concentração da biomassa. Em seguida, a amostra coletada foi lavada com água deionizada, caracterizada e armazenada a 4° C.

Figura 4 - Coleta da biomassa algal: (a) lagoa de alta taxa. (b) concentração da biomassa algal com peneira granulométrica com abertura de 0,250mm tela em inox



Fonte: a autora (2022).

Tabela 1 – Dimensões da lagoa de alta taxa

Característica	Valores
Comprimento da lagoa (m)	6,0
Largura da lagoa (m)	1,4
Comprimento da chicana (m)	5,6
Espessura da chicana (m)	0,1
Altura da chicana (m)	0,9
Altura (m)	0,9
Altura máxima da lâmina d'água (m)	0,7
Área superficial total (m ²)	8,0
Volume útil máximo (m ³)	5,6
Volume total (m ³)	7,2

Fonte: Sátiro (2021).

4.1.2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça da cana-de-açúcar foi coletada em uma usina de produção de açúcar e etanol, localizada no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Foram realizadas ao todo duas coletas. A vinhaça foi armazenada a -20° C, após cada coleta, até sua caracterização e utilização nos experimentos.

Figura 5 - Coleta de vinhaça: (a) usina de produção de açúcar e etanol. (b) vinhaça de cana-de-açúcar



Fonte: a autora (2022).

4.1.3 Métodos analíticos

As análises físico-químicas realizadas para avaliar as características do inóculo e dos substratos seguiram a metodologia *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017), e estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros e métodos analíticos da caracterização de inóculo e substratos (Referência do método SM entre parênteses)

Parâmetro	Unidade	Método analítico
pH, temperatura	-	Eletrométrico (4500-H ⁺ B)
Alcalinidade total e parcial	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	Titulométrico (2320 B)
Demanda química de oxigênio (DQO)	mg O ₂ .L ⁻¹	Colorimétrico (5220 D)
Nitrogênio total Kjeldahl (NTK)	mg.L ⁻¹	Titulométrico (4500-NTK B)
Nitrogênio amoniacal	mg.L ⁻¹	Titulométrico (4500-NH ₃ B)
Fósforo total (P Total)	mg.L ⁻¹	Colorimétrico (5220 D)
Sólidos totais, totais voláteis e totais fixos (ST, SV, SF)	mg.L ⁻¹	Gravimétrico (2540 B.;D.; E)

Fonte: APHA (2017).

A análise e quantificação dos AGV foi realizada por meio de um cromatógrafo gasoso com detecção de ionização de chama (GC-FID) (*Agilent Technologies 7890A*, com coluna J&W GC Column DB-WAXERT 122-7332; 260°C; 30 m 250 µm x 0,25 µm). As condições do método estão apresentadas na Tabela 3 e os limites mínimos de detecção de concentração de cada ácido foram: acético (4,99 mg/L); propiônico (4,74 mg/L); isobutírico (4,43 mg/L); butírico (4,62 mg/L); isovalérico (4,35 mg/L); valérico (4,61 mg/L) e hexanóico (4,43 mg/L).

Tabela 3 - Condições cromatográficas para análise de AGV

Parâmetros GC-FID	
Modo de injeção	<i>Split</i> 1:10
Volume de injeção (µL)	2,0
Temperatura do injetor (°C)	250
Gás de arraste	H ₂
Fluxo na coluna (m.L ⁻¹ /min)	1,0
Temperatura do forno (°C)	200
Temperatura do detector (°C)	300
Tempo de corrida (min)	10,7

Fonte: a autora (2022).

A concentração do carbono orgânico total (COT) foi estimada através da concentração de matéria orgânica dos substratos, expressa em DQO, de acordo com a Equação (1) (DO CARMO; SILVA, 2012).

$$COT (mg.L^{-1}) = 0,425 * DQO (mg.L^{-1}) - 2,064 \quad (1)$$

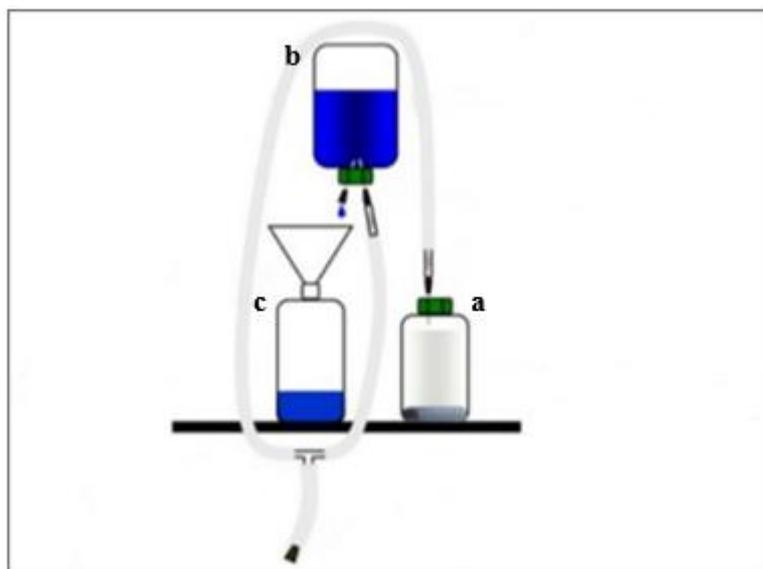
A biomassa algal foi caracterizada com relação a sua composição macromolecular. Foi identificada por meio de análise microscópica. Proteínas e lipídeos foram calculados como a percentagem em termos do conteúdo de sólidos totais da biomassa utilizada. O teor de lipídeos totais foi determinado utilizando o equipamento Soxhlet e a fração lipídica por gravimetria, pelo método adaptado de Bligh e Dyer (1959). O teor de proteínas foi determinado levando em consideração a concentração de NTK e o fator de conversão geral 6,25 (PRAJAPATI et al., 2014). A composição em termos de carboidratos foi calculada subtraindo o teor de cinzas, proteínas e lipídeos dos sólidos totais (SURESH et al., 2013).

4.2 TESTES DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

Foram realizados testes de potencial bioquímico de metano (PBM) para verificar a biodegradabilidade anaeróbia dos substratos estudados, os quais foram testados em diferentes combinações em conjunto com o inóculo (100% BA; 100% V e 50:50 BA e V). Os testes foram conduzidos em batelada, em frascos reatores de borossilicato com volume útil de 240 mL, realizados em triplicata para cada condição analisada. A relação substrato/inóculo adotada foi de 0,5g DQO·g⁻¹ SV, com concentração inicial do substrato de 0,89 g DQO·L⁻¹. (RAPOSO et al., 2009).

A produção de metano foi medida diariamente de acordo com Aquino et al., (2007) por meio de gravimetria, a partir do método de deslocamento de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH – 3% m/v), por meio de uma garrafa invertida conectada aos reatores através de mangueira cristal transparente, como exemplificado na Figura 6.

Figura 6 - Esquemática do aparato utilizado nos testes PBM: (a) frasco reator; (b) garrafa de vidro contendo solução de NaOH; (c) recipiente de plástico para coleta de líquido deslocado



Fonte: adaptado de Aquino *et al* (2007).

Após a adição do inóculo e dos substratos, o valor de pH foi corrigido para aproximadamente 7 utilizando solução de HCl 1M ou NaOH 40% m/v. Para garantir um sistema tamponado, foi adicionado bicarbonato de sódio (NaHCO_3) na proporção $1 \text{ g NaHCO}_3 \cdot \text{gDQO}_{\text{adicionada}}^{-1}$.

Os reatores foram lacrados com septos de borracha e purgados durante 2 minutos com gás nitrogênio, a fim de garantir condições anaeróbias ao sistema através da eliminação do oxigênio presente. Reatores controle também foram montados, compostos apenas de inóculo e alcalinizante, para verificar o volume de metano produzido a partir da respiração endógena.

A incubação foi realizada em sala termostaticada, sob condições mesofílicas, temperatura de $30^\circ\text{C} (\pm 2)$, todos os reatores foram envoltos com papel alumínio para reduzir a exposição à luz e agitados manualmente antes de cada medição quantitativa de metano (Figura 7). O experimento foi conduzido por um período de 28 dias.

Figura 7 - Reatores instalados na sala termostatizada no LSA, UFPE



Fonte: a autora (2022).

Foram realizadas no início e no final do experimento análises físico-químicas para caracterizar o meio reacional de cada reator. Ao final do experimento, o biogás acumulado no headspace dos reatores foi caracterizado por meio de cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo *Agilent Technologies GC 7890 A*, com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar (Carboxen 1010 PLOT, 30m x 0,53mm). O método de determinação está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições cromatográficas para análise de composição do biogás

Parâmetros GC-TCD	
Modo de injeção	<i>Split 50:1</i>
Volume de injeção (mL)	0,2
Temperatura do injetor (°C)	100
Gás de arraste	Ar
Fluxo na coluna (m.L ⁻¹ /min)	3
Temperatura do forno (°C)	150
Temperatura do detector (°C)	200
Tempo de corrida (min)	3,5

Fonte: a autora (2022).

Os volumes acumulados de metano de cada reator foram convertidos para as Condições Normal de Temperatura e Pressão (CNTP), de 0 °C ou 273K e 1 atm. Por fim, o potencial bioquímico de metano foi calculado de acordo com a Equação (2).

$$PBM = \frac{NmL CH_4}{gDQO_{ad}} \quad (2)$$

Onde:

PBM: potencial bioquímico de metano ($NmL CH_4 \cdot gDQO_{adicionado}^{-1}$);

$NmL CH_4$: volume acumulado de metano nas CNTP (NmL);

$gDQO_{ad}$: massa de DQO adicionada ao reator (g DQO);

4.2.1 Biodegradabilidade anaeróbia

As três condições testadas (100% BA; 100% V e 50:50 BA e V) também foram analisadas acerca da biodegradabilidade anaeróbia (%), a qual foi verificada a partir do volume líquido de metano (NmL) e seu rendimento teórico (350 mL CH_4/g DQO removida), levando em consideração a DQO inicial de cada ensaio, conforme Equação (3) (PASSOS; GARCÍA; FERRER, 2013).

$$Biodegradabilidade (\%) = \frac{[(CH_4(NmL)/350 (NmL CH_4/gDQO_{removida}))]}{gDQO_{ad}} * 100 \quad (3)$$

Onde:

$NmL CH_4$: volume acumulado de metano nas CNTP (NmL);

$gDQO_{ad}$: massa de DQO adicionada ao reator (g DQO);

4.2.2 Índice de sinergia (IS)

Neste estudo, o índice de sinergia (IS) foi calculado a fim de avaliar o efeito sinérgico da codigestão da mistura de vinhaça e biomassa algal. Esse índice foi determinado como a razão do rendimento de metano observado e o rendimento de metano esperado, conforme Equação (4) (DONOSO-BRAVO et al., 2019).

$$IS = \frac{CH_4 \text{ observado}}{CH_4 \text{ esperado}} \quad (4)$$

4.3 EXPERIMENTO SEMICONTÍNUO DE DOIS ESTÁGIOS

Para o escalonamento do experimento PBM realizado em escala laboratorial, foi realizada a avaliação do potencial da codigestão de biomassa algal (BA) com o resíduo orgânico industrial vinhaça (V) para a produção de AGV e metano em reatores semicontínuos de dois estágios, em escala bancada.

Empregou-se um reator acidogênico (RA) com agitação contínua, utilizando um frasco de boro-silicato com volume total de aproximadamente 2200 mL e volume útil de aproximadamente 1800 mL.

Um reator metanogênico (RM) com agitação contínua foi empregado utilizando um frasco de acrílico com volume total de aproximadamente 3200 mL e volume útil de aproximadamente 2750 mL. Os reatores RA e RM podem ser visualizados na Figura 8.

Figura 8 - Reatores anaeróbios de dois estágios em escala bancada



Fonte: a autora (2022).

4.3.1 Condições operacionais do reator acidogênico (RA)

A partida do RA foi estruturada em sua inoculação a partir da fermentação natural da vinhaça, de modo a promover a adaptação da biomassa. Foram inseridos 1,8 litros de vinhaça ao reator e realizado ajuste de pH para 6,5 (a partir do 13º dia) utilizando solução de hidróxido de sódio (40% m/v), passando a ser um preparo padrão.

O reator foi continuamente operado em condições controladas de temperatura ($30^{\circ}\text{C} \pm 2$), mantido sob agitação por meio de uma barra magnética movida por agitador magnético. A alimentação foi realizada de modo semicontínuo, uma vez ao dia, obedecendo às condições operacionais que foram mantidas durante todo o período de experimento, com COV aplicada constante de $5,62 \text{ kg DQO m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, TDH de 4 dias, e a vazão (Q) de alimentação de 0,45L (Tabela 5).

Tabela 5 - Condições operacionais do reator acidogênico (RA)

Condições operacionais	RA	Unidade
Volume útil	1,8	L
TDH	4	dias
Vazão de alimentação	0,45	L
Carga orgânica volumétrica	5,62	kg DQO $\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$

Fonte: a autora (2022).

4.3.2 Condições operacionais do reator metanogênico (RM)

Para a partida do sistema, todo volume útil do RM foi preenchido com inóculo, ou seja, lodo proveniente do reator anaeróbico da indústria de produção de cerveja, de modo a acelerar a adaptação do inóculo ao substrato e impulsionar uma fase estacionária ao sistema.

O reator metanogênico foi continuamente operado em condições controladas de temperatura ($30^{\circ}\text{C} \pm 2$), mantido sob agitação por meio de uma barra magnética movida por agitador magnético. A sua alimentação foi realizada de modo semicontínuo, uma vez ao dia, desde o primeiro dia de operação, com o efluente do reator acidogênico, o líquido fermentado, o qual foi submetido a uma diluição para atender às condições operacionais desejáveis, que foram mantidas durante todo o período de experimento, com COV aplicada constante de $0,25 \text{ kg DQO m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, TDH de 22 dias, e vazão (Q) de alimentação de 0,125L (Tabela 6).

Tabela 6 - Condições operacionais do reator metanogênico (RM)

Condições operacionais	RM	Unidade
Volume útil	2,75	L
TDH	22	dias
Vazão de alimentação	0,125	L
Carga orgânica volumétrica	0,25	kg DQO $\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$

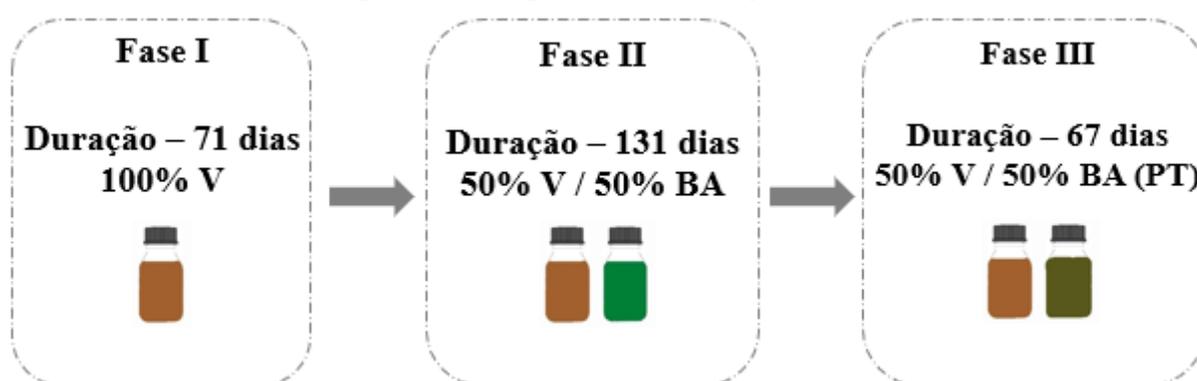
Fonte: a autora (2022).

4.3.3 Fases experimentais

O experimento teve duração de 270 dias, a partir do desenvolvimento de 3 fases distintas: digestão anaeróbia de vinhaça, codigestão de vinhaça e biomassa algal, e codigestão de vinhaça e biomassa algal pré-tratada (Figura 9).

A primeira fase operacional compreendeu a partida dos reatores, estruturada no processo de digestão anaeróbia da vinhaça, em que se desenvolveu durante 71 dias. A partir do 72º dia foi iniciada a codigestão de BA e V (50:50), correspondente à segunda fase do experimento, a qual teve a duração de 131 dias. Por fim, a fase III simulou o período correspondente à observação da influência do pré-tratamento da biomassa algal na codigestão com vinhaça.

Figura 9 - Fluxograma das fases experimentais



Fonte: a autora (2022).

Em que: V: Vinhaça. BA: Biomassa algal. BA(PT): Biomassa algal pré-tratada

4.3.4 Cálculo das condições operacionais hidráulicas

Para o cálculo das condições operacionais hidráulicas, utilizou-se as Equações (5) e (6) de TDH expresso em dias e COV expressa em $\text{kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, levando em consideração uma concentração do substrato (S_0), vazão como variável dependente, ciente de que a vazão fornecida deve ser numericamente igual para ambos os parâmetros e volume do reator. Além disso, uma vez que o cosubstrato é uma mistura de dois substratos (BA e V), usou-se também a Equação (7) da concentração da mistura (C_m) que considera a proporção de cada substrato (50:50), incluídos como S_1 e S_2 com base em sua concentração em termos de DQO e suas respectivas vazões Q_1 e Q_2 , considerando cada substrato individualmente.

$$TDH = \frac{V}{Q} \quad (5)$$

$$COV = \frac{Q \times S_0}{V} \quad (6)$$

$$Cm = \frac{(S1 \times Q1) + (S2 \times Q2)}{(Q1 + Q2)} \quad (7)$$

4.3.5 Método de alimentação dos reatores

Para minimizar a contaminação atmosférica, garantindo o estado anaeróbio dos reatores e a pureza do biogás, o processo de alimentação e retirada de efluente dos reatores utiliza vácuo, sobre pressão e sifonamento, sem abertura para a atmosfera no momento da alimentação. Para tal, as tampas dos reatores foram configuradas com três aberturas: a primeira para entrada do afluente, a segunda para retirada do efluente e a terceira para condução do biogás.

4.3.6 Avaliação do desempenho e estabilidade dos reatores: Métodos analíticos

O desempenho e estabilidade de ambos os reatores, em termos de fase líquida, das amostras afluentes e efluentes, durante todo o período de operação baseou-se no monitoramento analítico regular dos seguintes parâmetros: pH, alcalinidade total e parcial, nitrogênio amoniacal, teor de sólidos totais, voláteis e fixos, bem como a concentração de AGV. A partir da segunda fase operacional, foram realizadas em conjunto análises da demanda química de oxigênio total (DQOt) e solúvel (DQOs). Os parâmetros físico-químicos, as metodologias e a frequência das análises empregadas são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de desempenho e estabilidade dos reatores (Referência do método SM entre parênteses)

Parâmetro	Unidade	Frequência	Método analítico
pH, Temperatura		Diária	Eletrométrico (4500-H+ B)
Potencial de oxirredução (ORP)	mV	Diária	Potenciométrico (Hach®, HQ40d)
Alcalinidade total e parcial	mg CaCO ₃ ·L ⁻¹	3x semana	Titulométrico (2320 B)
Demanda química de oxigênio total (DQOt)	mg O ₂ ·L ⁻¹	3x semana	Colorimétrico (5220 D)
Demanda química de oxigênio solúvel (DQOs)	mg O ₂ ·L ⁻¹	3x semana	Colorimétrico (5220 D)
Nitrogênio amoniacal	mg·L ⁻¹	3x semana	Titulométrico (4500-NH ₃ B)
Ácidos graxos voláteis	mg·L ⁻¹	3x semana	Cromatografia gasosa (GC-FID)
Série de sólidos (ST, SV, SF)	mg·L ⁻¹	1x semana	Gravimétrico (2540 B.;D.; E)

Fonte: APHA (2017).

A análise e quantificação dos AGV foi realizada por meio de um cromatógrafo gasoso com detecção de ionização de chama (GC-FID) (*Agilent Technologies* 7890A, com coluna J&W GC Column DB-WAXERT 122-7332; 260°C; 30 m 250 µm x 0,25 µm), conforme mencionado na Tabela 3.

A produção quantitativa de biogás em cada reator foi medida diariamente por micromedidor de gás (Ritter). Ao longo das três fases do experimento a metodologia de medição migrou para o deslocamento de volume, de acordo com Aquino *et al.* (2007), similar ao esquema apresentado na Figura 6.

A análise da composição do biogás, hidrogênio, nitrogênio, metano, dióxido de carbono, foi realizada por cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo *Agilent Technologies* GC 7890 A, com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar (Carboxen 1010 PLOT, 30m x 0,53mm) (Tabela 4).

Com a finalidade de verificar o rendimento de metano do reator metanogênico foi realizada a divisão da produção de metano alcançada durante o dia nas condições normais de temperatura e pressão (NmL CH₄·d⁻¹) pela massa de DQO que foi adicionada ao reator (g DQOad).

4.3.7 Pré-tratamento térmico da biomassa algal

Um pré-tratamento hidrotérmico de autoclavagem foi realizado na biomassa algal, a fim de proporcionar um aumento da solubilidade do substrato. Conduzido em garrafas de borossilicato com volume total de 500 mL, as quais foram dispostas em autoclave vertical (marca Phoenix, linha 50 litros, pressão máxima de 3 kgf/cm²) à temperatura de 120°C, durante um tempo de exposição de 40 minutos, pressão de 1 kgf/cm² com queda gradual 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 em estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa no LSA (Martins, 2019).

A fim de determinar a eficiência do pré-tratamento, o grau de solubilização (SD), expresso em percentual (%), foi calculado conforme a Equação (8), onde a DQOs corresponde a concentração de DQO solúvel após o pré-tratamento, a DQOs0 corresponde a concentração de DQO solúvel na biomassa antes do pré-tratamento e a DQOt corresponde a concentração de DQO total da biomassa antes do pré-tratamento (DONOSO-BRAVO et al., 2011).

$$SD = \frac{DQOs - DQOs0}{DQOt - DQOs0} \times 100 \quad (8)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseado nos materiais utilizados e na metodologia utilizada para o desenvolvimento de cada etapa experimental, os resultados alcançados serão apresentados nesta seção.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi caracterizado por meio de análises físico-químicas, e os resultados estão apresentados na Tabela 8, na forma de média \pm desvio padrão, levando em consideração a única coleta realizada.

Tabela 8 - Caracterização do lodo utilizado como inóculo

Parâmetros	Valores
pH	7,5 \pm 0,1
Sólidos totais (mg·L ⁻¹)	45302 \pm 198
Sólidos voláteis (mg·L ⁻¹)	38230 \pm 803
SV/ST (%)	83,3
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	1261,9 \pm 50
Alcalinidade parcial (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	793,1 \pm 50

Fonte: a autora (2022).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

A Figura 10 apresenta a imagem microscópica da biomassa algal utilizada nos experimentos. A biomassa era composta predominantemente por microalgas do gênero *Chlorella* sp. e pelo gênero *Desmodesmus* sp. em quantidades menores (SANT'ANNA et al. 2012). Na Tabela 9, podem ser observados os resultados da caracterização da biomassa algal.

Figura 10 - Imagem microscópica da biomassa algal oriunda da LAT. Magnitude: 40x



Fonte: a autora (2022).

O pH apresentou valor neutro e, portanto, adequado para digestão anaeróbia. Além disso, encontrou-se uma relação C/N de 8,24, o que é considerada baixa, relacionada sobretudo ao seu alto teor de nitrogênio ($2326,8 \text{ mg. L}^{-1}$), dessa forma, a inibição do metabolismo anaeróbio devido ao acúmulo de amônia é facilitada, o que justifica a busca por cosubstratos que aumentem esta relação. O alto teor de nitrogênio é consequência da alta fração de proteínas na biomassa (28,02%). As frações de carboidratos e lipídeos representaram 20,11% e 17,64% dos sólidos totais, respectivamente. Em termos de matéria orgânica, apenas 1,16% da DQO estava na forma solúvel, ou seja, uma pequena fração estava rapidamente disponível para degradação microbiana.

Tabela 9 – Caracterização da biomassa algal utilizada nos experimentos

Parâmetros	Valores
pH	6,8 ± 0,2
DQO total (mg O ₂ ·L ⁻¹)	45115,54 ± 103,36
DQO solúvel (mg O ₂ ·L ⁻¹)	522,47 ± 2
DQOs/DQOt (%)	1,16
COT (mg·L ⁻¹)	19172 ± 958
Nitrogênio total Kjeldahl (mg·L ⁻¹)	2326,80 ± 4
Nitrogênio amoniacal (mg·L ⁻¹)	232,80 ± 8,5
C/N ¹	8,24
Fósforo total (mg·L ⁻¹)	145,5 ± 8,5
Sólidos totais (mg·L ⁻¹)	51887,50 ± 786
Sólidos voláteis (mg·L ⁻¹)	34132,50 ± 622
SV/ST (%)	65,78
Proteínas (% ST)	28,02
Lipídeos (% ST)	17,64
Carboidratos (% ST)	20,11
Cinzas (% ST)	34,23

Fonte: a autora (2022).

¹C/N: COT/NTK.

A Tabela 10 apresenta os resultados alcançados da caracterização da vinhaça (média ± desvio padrão). É possível observar diferenças quando comparada com a BA, principalmente em relação ao pH ácido (devido ao emprego de H₂SO₄ no processo de produção do etanol) e à alta relação C/N.

Tabela 10 - Caracterização da vinhaça utilizada nos experimentos

Parâmetros	Valores
pH	3,77
DQO total (mg O ₂ ·L ⁻¹)	25767 ± 115,42
COT (mg·L ⁻¹)	10949
Nitrogênio total Kjeldahl (mg·L ⁻¹)	180,60 ± 7
Nitrogênio amoniacal (mg·L ⁻¹)	7,56 ± 0,84
C/N ¹	60,63
Fósforo total (mg·L ⁻¹)	76,40 ± 3,48
Sólidos totais (mg·L ⁻¹)	24972 ± 196,49
Sólidos voláteis (mg·L ⁻¹)	17704 ± 145,35
SV/ST (%)	70,89

Fonte: a autora (2022).

¹C/N: COT/NTK.

5.2.1 Caracterização da biomassa pré-tratada

A Tabela 11 apresenta os resultados oriundos da caracterização da biomassa algal após o pré-tratamento térmico de alta pressão por meio de autoclavagem. Os resultados demonstram efeitos positivos na solubilização da BA, uma vez que os resultados obtidos para a DQO solúvel foram cerca de 15 vezes superior que a DQO solúvel sem o pré-tratamento ($522,47 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Por outro lado, a eficiência do pré-tratamento foi um pouco inferior do que encontrado por outros autores, Alzate et al. (2012) e Cho et al. (2013), dado que estes alcançaram um aumento de 29% na solubilização de matéria orgânica ao tratar termicamente uma mistura de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. a 120°C por 30 min, em comparação com o presente estudo (aproximadamente 16%). Esta diferença está associada com a alta concentração de DQO determinada para a biomassa algal no estudo ($45115,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), diferentemente das concentrações encontradas nos estudos citados acima. Em termos da relação DQOs/DQOt, é possível observar um valor de 16,31% após o pré-tratamento.

Tabela 11 - Caracterização da biomassa algal após o pré-tratamento

Parâmetros	Valores
pH	6,7
DQO total ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	$46408,7 \pm 125,32$
DQO solúvel ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	$7571,2 \pm 1,85$
DQOs/DQOt (%)	16,3
COT ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	19721,6
Nitrogênio total Kjeldahl ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$2485,0 \pm 61,25$
Nitrogênio amoniacal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$97,5 \pm 2,55$
C/N ¹	7,94
Fósforo total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	-
Sólidos totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	36216,67
Sólidos voláteis ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	30011,11
SV/ST (%)	82,87

Fonte: A autora (2022).

¹C/N: COT/NTK.

5.2.2 Caracterização do cosubstrato (alimentação) do sistema de dois estágios

A Tabela 12 apresenta os resultados referentes a caracterização dos cosubstratos utilizados nos experimentos realizados neste trabalho, respeitando uma relação de biomassa algal sem pré-tratamento (BA) e com pré-tratamento (BA(PT)) e vinhaça (50:50) com base em DQO.

Como esperado, pode-se observar que apesar de possuírem a mesma concentração em termos de DQO, o efeito do pré-tratamento possibilita também um aumento da solubilidade do cosubstrato. Entretanto, em termos da relação C/N, a mistura com BA pré-tratada provocou a sua diminuição, tendo em vista que a hidrólise da biomassa provocou um rompimento da parede celular rica em proteínas, consequentemente liberando nitrogênio para o meio.

Tabela 12 - Caracterização dos cosubstratos biomassa algal (sem e com pré-tratamento) e vinhaça (50:50)

Parâmetros	BA:V (50:50)	BA(PT):V (50:50)
pH	5,49 ± 0,2	4,98 ± 0,2
DQO total (mg O ₂ ·L ⁻¹)	22500	22500
DQO solúvel (mg O ₂ ·L ⁻¹)	9030,02 ± 48,72	11342,66
DQOs/DQOt (%)	41,05	51,56
COT (mg·L ⁻¹)	9347,94	9347,94
Nitrogênio total Kjeldahl (mg·L ⁻¹)	700,20 ± 30,09	1054,10 ± 51,6
Nitrogênio amoniacal (mg·L ⁻¹)	62,59 ± 2,5	213,05 ± 7
C/N ¹	13,35	8,87
Sólidos totais (mg·L ⁻¹)	30570,07	17850,00
Sólidos voláteis (mg·L ⁻¹)	17179,52	12684,44
SV/ST (%)	56,20	71,06

Fonte: a Autora (2022).

¹C/N: COT/NTK.

5.3 TESTES DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO

Os ensaios PBM apresentaram resultados diferentes para cada condição C/N testada. Os valores obtidos para produção específica de CH₄, (expressa em volume de CH₄ por massa de DQO adicionada), concentração de CH₄ no biogás, biodegradabilidade e índice de sinergia podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 - Relação C/N, PBM, percentual de metano no biogás, biodegradabilidade e índice de sinergia (média \pm desvio padrão)

Ensaio	% com base em DQO		C/N ¹	PBM (NmL CH ₄ ·gDQO _{ad} ⁻¹)	% CH ₄ ²	Biodegradabilidade (%)	Índice de sinergia (IS)
	BA	V					
1	100	0	8,2	100,9 \pm 0,1	63,1 \pm 0,7	28,9 \pm 0,5	-
2	0	100	60,6	297, 2 \pm 0,3	73,3 \pm 0,4	85 \pm 1,4	-
3	50	50	13,3	222,4 \pm 0,3	70,4 \pm 0,0	63,7 \pm 0,2	1,12 \pm 0,00

Fonte: a autora (2022).

BA: biomassa algal. V: vinhaça. ¹Estimada a partir das relações C/N de cada substrato. ²Percentual final de metano no biogás.

O alto teor de carbono presente na vinhaça (Tabela 10), contribuiu para o alcance de uma alta relação C/N, proporcionando um ajuste da disposição de carbono e nitrogênio na codigestão de vinhaça e biomassa algal (50:50), enquadrando essa condição em uma faixa mais próxima ao que literatura aborda como ideal, entre 15 e 30 (YEN; BRUNE, 2007; RODRIGUEZ et al., 2018; SOLÉ-BUNDÓ et al., 2019b).

Além disso, é possível perceber uma produção acumulada de 222,41 NmL CH₄·gDQO_{ad}⁻¹ para o ensaio de codigestão (ensaio 3), representando um aumento de 120% quando comparada com a produção no ensaio de digestão de biomassa algal (ensaio 1, 100,89 NmL CH₄·gDQO_{ad}⁻¹). Apesar do maior acúmulo de CH₄ ter sido observado para o ensaio de DA de vinhaça (ensaio 3), é possível enfatizar, com base nesses experimentos, que a codigestão é a melhor condição quando há o interesse na utilização de biomassa algal. NOTA.

O teste de digestão utilizando apenas biomassa algal apresentou a menor biodegradabilidade dentre as misturas avaliadas (28,97 \pm 0,55%), resultado um pouco inferior do que foi relatado por trabalhos desenvolvidos por Wang et al. (2016) (41%) para *Chlorella* sp., com baixos valores devido à resistência da parede celular. Por outro lado, a média da biodegradabilidade da vinhaça de cana-de-açúcar (85,02 \pm 1,44%), foi relativamente maior que o valor obtido para a biomassa algal, o que pode estar associado à presença de maior fração de matéria orgânica prontamente disponível para degradação. No teste de codigestão BA:V (ensaio 3), a biodegradabilidade aumentou cerca de 120% em relação ao teste realizado apenas com BA.

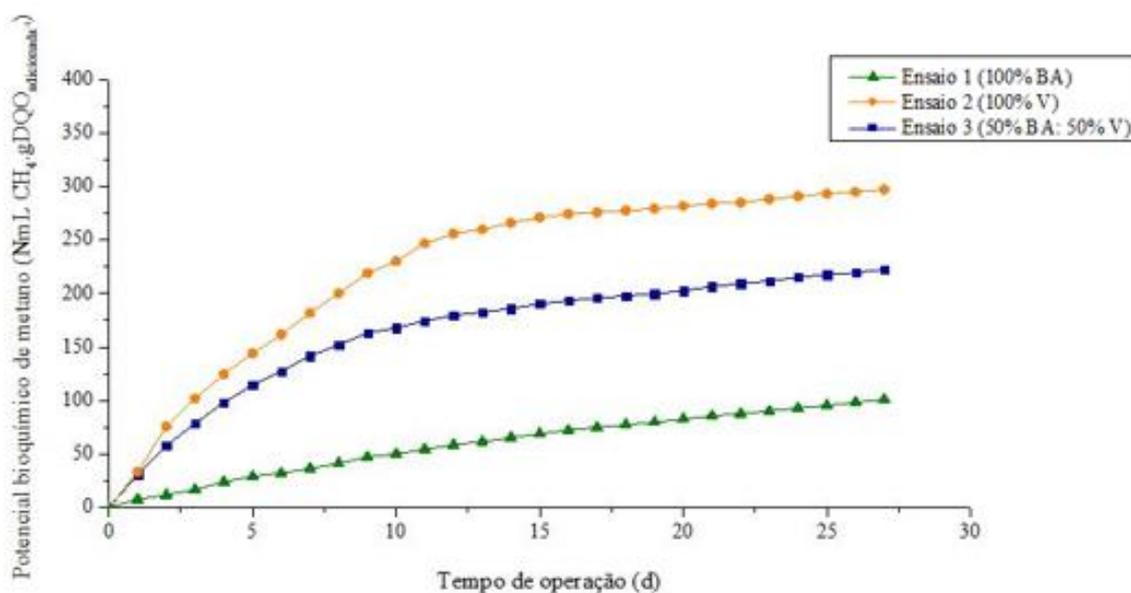
Para verificar os efeitos sinérgicos no ensaio 3, o rendimento teórico da mistura foi calculado com base na Equação (4). Conforme observado na Tabela 13, o índice de sinergia foi

maior do que 1, indicando que houve um aumento de cerca 12% no rendimento de metano quando comparado ao rendimento teórico estimado.

As três condições avaliadas por meio de testes PBM apresentaram diferentes perfis de produção de metano, e as diferenças entre elas se tornaram mais aparentes ao longo do período experimental (Figura 11).

Assim como exposto na Tabela 13, é possível observar também na Figura 11 que ao final dos 28 dias de experimento, a biomassa algal apresentou o menor valor de potencial bioquímico de metano, $100,89 \pm 0,1 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{ad}}^{-1}$, quando digerida individualmente. Mas, apesar desse baixo rendimento de metano, a Figura 11 traz uma melhor apresentação de como as três condições testadas se comportaram durante os 28 dias sendo possível perceber uma melhora em relação ao rendimento com o ensaio de codigestão de BA e V, como mencionado anteriormente.

Figura 11 - PBM acumulado para as condições de digestão e codigestão testadas



Fonte: A autora (2022).

Dessa forma, é possível concluir que houve vantagem no ensaio 3, codigestão BA:V, com produção de metano compatível com potencial de reaproveitamento energético. Desta forma, um escalonamento deste processo de codigestão foi testado em sistema de reator de dois estágios.

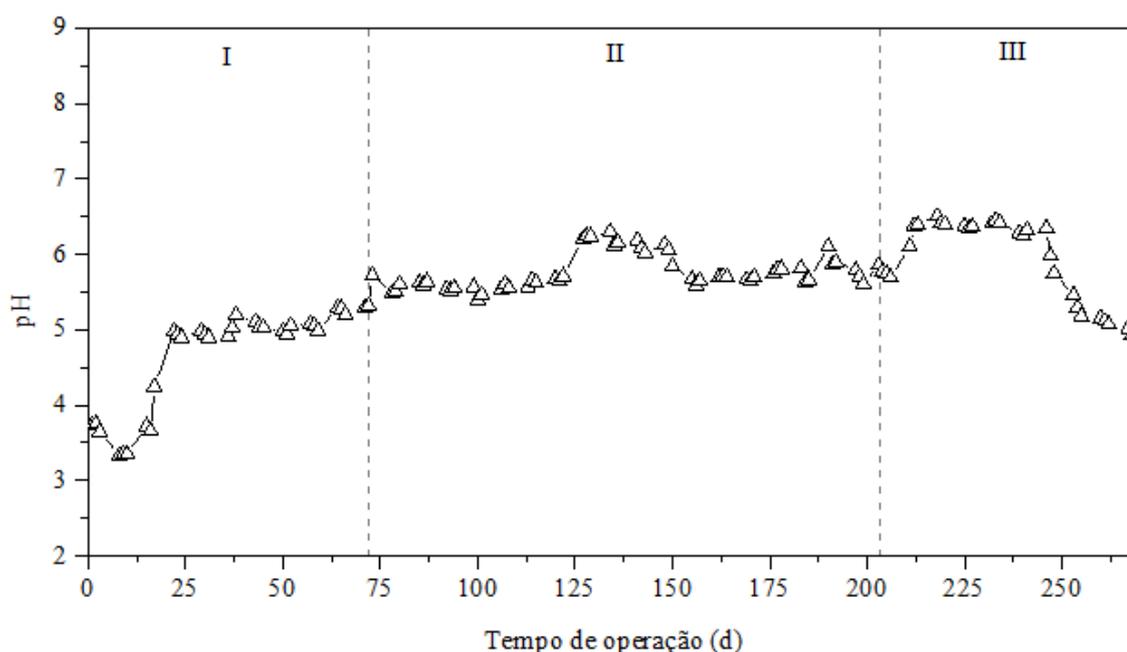
5.4 EXPERIMENTO SEMICONTÍNUO DE DOIS ESTÁGIOS

5.4.1 Estabilidade do reator acidogênico (RA)

A estabilidade do sistema anaeróbio pode ser entendida como a avaliação das condições ambientais existentes no reator. Ela é importante para manter uma produção de subprodutos de valor agregado (metano, hidrogênio, ácidos graxos voláteis) de maneira consistente, tendo em vista que diversos fatores podem afetar essa estabilidade (MAO et al., 2015). Neste estudo, pH, nitrogênio amoniacal e produção de AGV foram monitorados, como indicado na Tabela 7.

A Figura 12 mostra os valores de pH encontrados durante todo o período de operação do RA, para as três fases experimentais.

Figura 12 – Variação do pH do reator acidogênico ao longo do tempo



Fonte: a autora (2022).

Como pode ser observado, o pH manteve-se inferior a 4,0 nos 15 primeiros dias, tendo em vista a não correção do pH do substrato (vinhaça) para 6,5, valor considerado ideal por Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015), para o alcance da fermentação da vinhaça. Após a correção do pH do substrato no reator com solução de NaOH (40% m/v), o pH manteve-se constante durante todo o período de digestão anaeróbia da vinhaça (Fase I) em torno de $5,2 \pm 0,2$.

A Fase II, iniciada no 72º dia operacional com adição de BA à alimentação dos reatores, resultou em pequena elevação do pH efluente, apresentando valores em torno de $5,5 \pm 0,2$ durante aproximadamente 50 dias. Entretanto, após esse período de pH constante, foi observada instabilidade, aumento do pH face ao observado no período constante, alcançando o valor médio de 6,2 durante um período de 5 TDHs. Com isso, após a interrupção da correção do pH do cosubstrato para 6,5, o pH efluente voltou a apresentar uma condição mais estável, similar ao que havia sido encontrado anteriormente ($5,5 \pm 0,2$).

O pré-tratamento da BA resultou em um aumento do valor do pH do reator fermentador na Fase III. O valor manteve estável durante 35 dias, com uma média de $6,4 \pm 0,2$. Nesta fase foi observada, portanto, o maior valor de pH para o reator acidogênico, o que proporcionou mudanças de metabolismo, como por exemplo maior produção volumétrica de metano. A fim de reduzir o valor do pH e proporcionar melhor condição de fermentação, foi reduzido o TDH para promover pressão na seleção de microrganismos fermentadores e voltar uma condição de pH favorável à acidogênese, o que foi alcançado com êxito (indicar os valores finais na fase III).

A dinâmica apresentada na Figura 13 diz respeito à produção de AGV obtida em cada etapa do experimento. Como é possível observar, a Figura 13a mostra o acúmulo de AGV total no sistema e os principais ácidos encontrados durante as três etapas experimentais e sua distribuição. Durante a Fase I é possível verificar um aumento gradativo de três ácidos havendo maior composição de ácido acético e ácido butírico, alcançando valores de 2874,6 e 2547,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, enquanto a concentração de ácido propiônico foi de 951,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ao final dessa etapa. A concentração de AGV total (soma de todos os ácidos individuais) ascendeu a 7802,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ no RA no último dia da Fase I (dia 71), se caracterizando pela maior produção de AGV total durante o período experimental (Figura 13a), e maior estabilidade do pH do sistema (Figura 12).

O perfil de distribuição dos AGV mostra que os ácidos mais abundantes na Fase I foram os ácidos acético, butírico e propiônico, representando 40, 25 e 15% do total de AGV, respectivamente (Figura 13b). Ao contrário, os demais ácidos apresentaram menor abundância, representando menos de 10% do total de ácidos produzidos.

Tena, Perez e Solera (2021) avaliaram a DA de vinhaça e a codigestão com lodo de esgoto em reator de estágio único do tipo CSTR. Nos experimentos de DA de vinhaça foi alcançada produção total de 1390 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AGV, enquanto no processo de codigestão foi relatado produção de 2140 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. De maneira comparativa, o presente trabalho obteve uma produção de AGV total superior para ambas as condições testadas (digestão e codigestão de

vinhaça), fato este decorrente da implementação do sistema de dois estágios, tendo em vista o direcionamento da produção de ácidos no primeiro reator sem que haja monitoramento acerca de uma possível inibição da metanogênese, como necessário em reatores de estágio único.

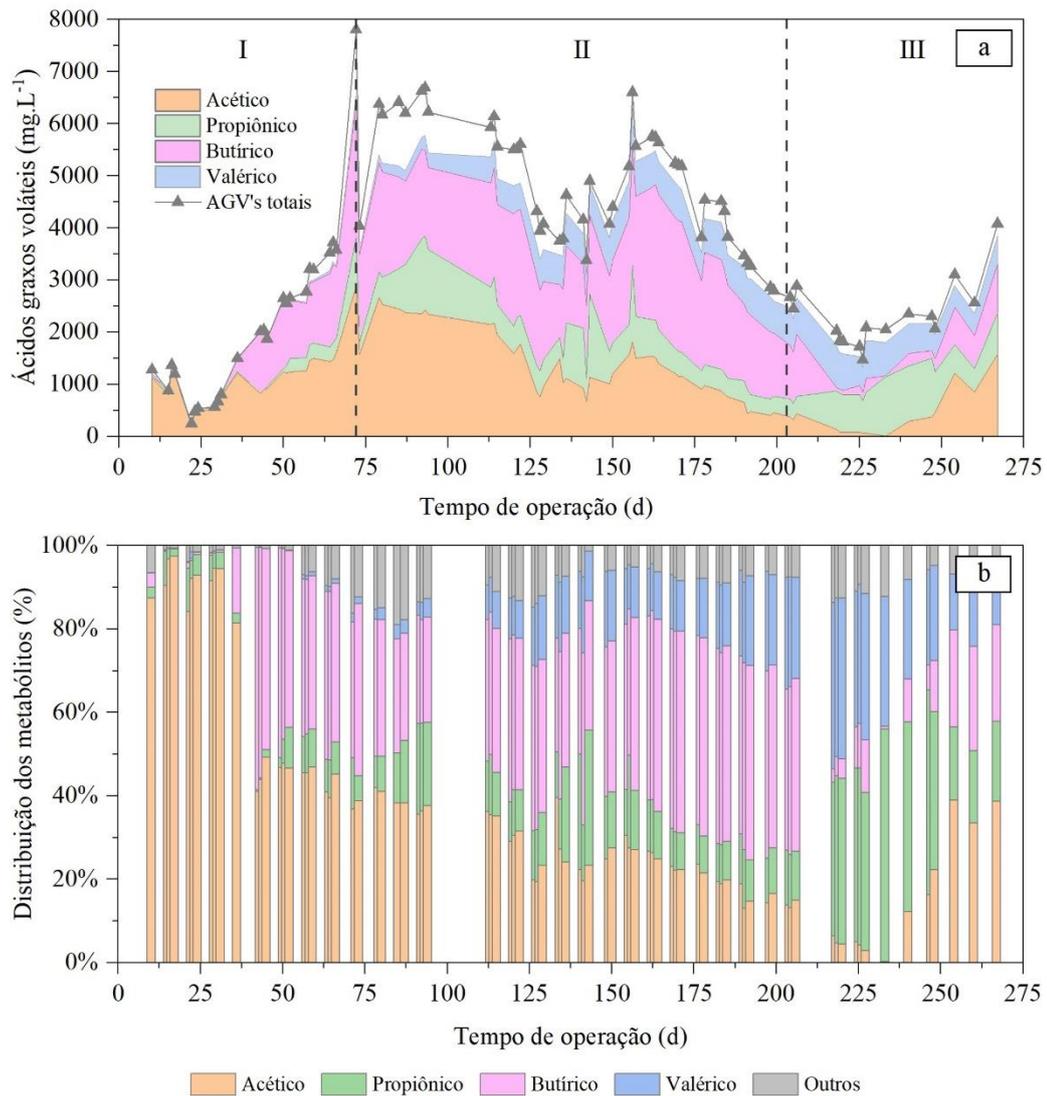
Nos primeiros dias da Fase II foi possível observar uma redução e instabilidade na produção do ácido acético e ácido butírico os quais eram os mais representativos dos AGV totais na Fase I. Essa alteração representou para o sistema uma redução de aproximadamente 48% na produção total de ácidos, uma redução de $3770 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Em relação aos ácidos individuais, a diminuição foi de 45,5, 34,6 e 74,4% para os ácidos acético, butírico e propiônico, respectivamente. Ou seja, introduzir biomassa algal no sistema proporcionou redução e instabilidade na produção de ácidos por ser um substrato que possui dificuldade de hidrólise devido a rigidez da parede celular, tendo em vista que o sistema estava com uma grande quantidade de AGV disponível, produtos da digestão de vinhaça e possivelmente com uma grande disponibilidade de enzimas hidrolíticas para continuação do processo de DA.

Após os primeiros dias de codigestão (Fase II) foi possível observar um incremento na concentração de ácidos, em que o ácido acético e o ácido butírico, por exemplo, mantiveram-se maiores ou iguais $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante aproximadamente 40 dias, isto é, um período de maior estabilidade na fermentação. Além disso, observou-se um incremento nas concentrações do ácido valérico, uma vez não encontrado na digestão anaeróbia de vinhaça, Fase I (Figura 13).

Correlacionando o pH do sistema e a produção de ácidos (Figuras 12 e 13), pode-se observar que o período de maior redução de AGV no RA durante a Fase II foi semelhante ao período de aumento do pH, o que proporcionou uma situação de instabilidade no sistema, tendo em vista o objetivo do RA na produção de ácidos. A adição de BA no sistema provocou ainda um aumento na produção de ácido propiônico, alcançando valores próximos a $1440,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que se comparado com o dia de maior produção deste ácido na fase anterior ($951,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a introdução de BA contribuiu com um aumento de 51,5% nos primeiros 20 dias de codigestão. O aumento da concentração de ácido propiônico obtido no presente estudo pode estar relacionado ao alto teor protéico da biomassa algal utilizada como matéria-prima.

De forma similar, o ácido valérico obteve uma maior representatividade a partir da Fase II, tendo em vista que ele não era identificado na Fase I (DA vinhaça), o que mostra a influência da codigestão para a produção desse ácido. Regueira et al., (2020) afirmaram que os ácidos de cadeia ímpar, como propiônico e valérico, estão associados principalmente aos substratos ricos em proteínas, independente de qual faixa de pH o reator se encontra., o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo.

Figura 13 - Ácidos graxos voláteis presentes no efluente do RA: (a) concentração ao longo do tempo (b) distribuição proporcional (outros: soma dos AGV intermediários e com 6 carbonos)



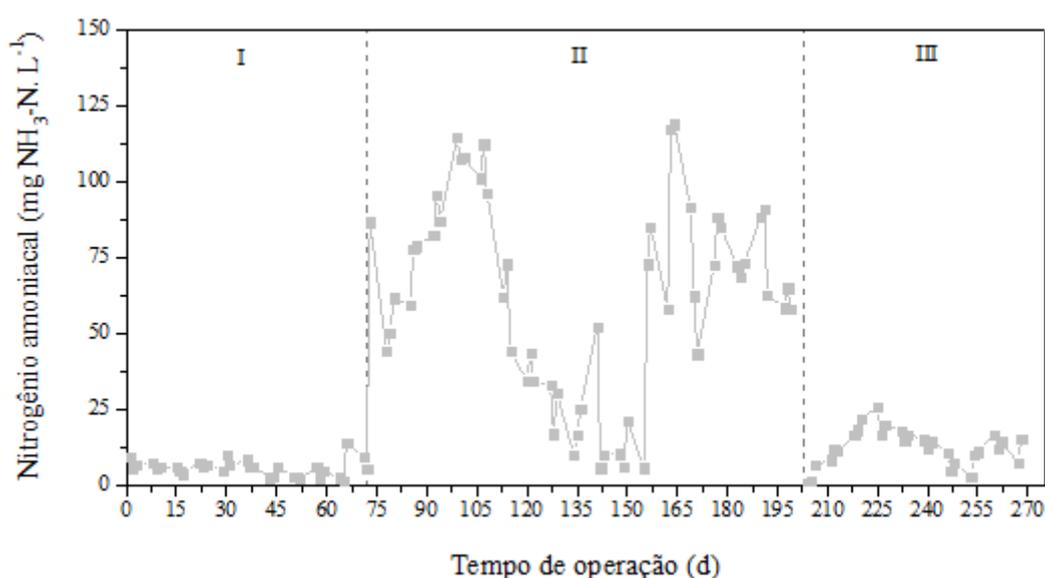
Fonte: A autora (2022).

A Fase III, caracterizada pela adição de BA pré-tratada ao sistema, provocou diminuição da fermentação de ácidos, seguindo a mesma tendência do que estava decorrente nos últimos dias de operação da Fase II, principal redução de ácido acético, ácido butírico e ácido valérico, e de maneira contrária, apresentando uma tendência de maior produção do ácido propiônico. Entretanto, mesmo apresentando valores em torno de 1150 mg.L⁻¹ de propiônico, caracterizando-o como o ácido de maior predominância da Fase III, ao final, o sistema apresentou uma tendência de recuperação da produção de AGV, com o ácido acético voltando a ter mais representatividade, representando uma predominância de aproximadamente 40% dos AGV e alcançando valores de 1575 mg.L⁻¹. E em termos de AGV totais, é possível observar na Figura 13a o alcance de altos valores de ácidos graxos voláteis, totalizando 4077,8 mg.L⁻¹.

De acordo com Xu et al. (2018) e Carrillo-Reyes et al. (2021) as bactérias pertencentes à família Clostridiales são os principais grupos de bactérias que desempenham a importante função na degradação dos ácidos graxos de cadeia longa em acetato. Os autores destacaram ainda a influência destas bactérias na diminuição da concentração de ácido acético e acúmulo de ácido propiônico, cenário observado principalmente na Fase III.

Com relação ao nitrogênio amoniacal (Figura 14) para as três fases analisadas neste estudo encontrou-se concentrações consideradas não inibitórias para o processo anaeróbio, inferiores a $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Figura 14 - Concentração de nitrogênio amoniacal no reator acidogênico



Fonte: A autora (2022).

A Fase I foi caracterizada pelas menores concentrações de nitrogênio amoniacal, no efluente do reator acidogênico, uma faixa estável inferior a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Apesar de estar associada às menores concentração de AGV obtidas na fase (Figura 13) com o pH do sistema inferior a 6,0 (Figura 12), esta situação pode estar mais ligada ao tipo de substrato utilizado, uma vez que houve uma produção crescente de ácidos ao longo do tempo e não foi suficiente para o aumento das concentrações de nitrogênio amoniacal no RA. Ou seja, baixas concentrações de amônia nessa etapa condizem com a utilização da vinhaça, tendo em vista que a caracterização desse substrato apresenta baixas concentrações de nitrogênio na composição (Tabela 10), quando comparado com a biomassa algal, por exemplo (Tabela 9).

Apesar de terem sido observadas concentrações ótimas durante todo o experimento, inferiores a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ao introduzir a BA no sistema (Fase II), foi observado um aumento

considerável de nitrogênio amoniacal durante aproximadamente 40 dias, com valores próximos a $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ como resposta do acúmulo de AGV, mantendo o nitrogênio em sua forma ionizada (N-NH_4^+). De acordo Cho et al. (2015) esse fato pode ser atribuído à decomposição do substrato BA devido a sua composição celular rica em proteínas, o que justifica a maior produção de AGV (Figura 13a) e o conseqüente aumento na concentração de nitrogênio amoniacal (Figura 14).

Após o 105º dia operacional (Figura 14) foi observada uma redução drástica das concentrações de nitrogênio amoniacal, e esse comportamento pode estar associado à redução de ácidos no sistema, que apesar de influenciar no aumento do pH, não foi o suficiente para formar nitrogênio na sua forma de amônia (NH_3). Entretanto, à medida que o RA apresentou novamente uma maior concentração de AGV no sistema, o pH voltou a normalidade, com uma média em torno de $5,5 \pm 0,2$, o que contribuiu para o alcance de maiores concentrações de nitrogênio amoniacal, condições apresentadas anteriormente e que corroboram com a ideia de Cho et al. (2015) de decomposição da biomassa algal.

Na Fase III (codigestão de vinhaça e biomassa algal pré-tratada) houve redução significativa de AGV no sistema, com valores próximos a $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 13a), principalmente em termos de ácido acético e ácido butírico, também contribuindo para um aumento do pH, valores próximos a 6,5. Essa alteração das concentrações em termos de produção de AGV provocou redução das concentrações de nitrogênio amoniacal, se comparados com a Fase II, de utilização de BA sem o pré-tratamento, situação contrária ao que era esperado, níveis superiores de AGV e conseqüentemente de nitrogênio amoniacal, tendo em vista que nessa fase a BA já se encontrava hidrolisada devido o pré-tratamento efetuado. Segundo Wei et al. (2015) a metanogênese seria inibida em concentrações superiores a $3000 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, valores não encontrados nesse estudo, o que corrobora com a hipótese de que houve uma adaptação de microrganismos metanogênicos no RA, o que levou ao consumo de AGV, principalmente ácido acético.

No estudo realizado por Schwede et al. (2013) microalgas pré-tratadas mostraram problemas de inibição quando digeridas em modo contínuo devido ao acúmulo de amônia. Apesar do pré-tratamento de autoclavagem ter ocasionado a hidrólise da parede celular da biomassa, não foram observadas concentrações que pudessem desenvolver efeito inibitório ao sistema.

As concentrações de N-NH_4^+ observadas neste estudo foram inferiores, em todas as etapas experimentais, às relatadas por González-Fernández et al. (2013) que atingiram

concentrações variando de 550 a 700 mg·L⁻¹ durante a digestão anaeróbica de *Scenedesmus* sp., e resultaram em efeito negativo mínimo sobre a fermentação.

5.4.2 Estabilidade do reator metanogênico (RM)

Para o reator metanogênico, alimentado com o fermentado do RA, os principais parâmetros de monitoramento durante as três fases experimentais foram o pH, alcalinidade parcial (AP), razão alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial (AI/AP) e nitrogênio amoniacal, a fim de inferir a estabilidade do reator (Figura 15).

Com relação ao pH, em todas as etapas desenvolvidas foi possível analisar uma faixa de variação entre 6,5 e 8,0, o que é relatado na literatura como intervalo ideal para que ocorra uma atividade metanogênica estável, tendo em vista que esse parâmetro é um dos mais críticos em sistemas de dois estágios (KUNZ et al., 2019; ZHANG; LOH; ZHANG, 2019).

Na Fase I, após os primeiros dias de alimentação, houve uma tendência à diminuição do pH, assim como consumo de AP no RM (Figura 15a, b), ocorrido devido as altas concentrações de AGV no fermentado, superiores a 1000 mg·L⁻¹ (Figura 13a). Ou seja, a Fase I obteve uma resposta mais variável à alimentação, uma faixa entre 6,5 e 8,0, alcançando uma média de 7,1 ± 0,2, devido a alimentação semicontínua e a inoculação do RM com lodo anaeróbio. Estes resultados mostram a não ocorrência de instabilidade no sistema na primeira fase operacional, devido a capacidade tampão do sistema, com valores de alcalinidade a bicarbonatos em torno de 2178,4 ± 537 mg CaCO₃·L⁻¹.

Na Fase II, apesar da alimentação do RM ter sido realizada com fermentado abundante em AGV (4858,4 mg·L⁻¹ ± 1096,8 e COV de 0,25 kg·m⁻³·d⁻¹), o pH permaneceu praticamente constante, com valor próximo a 6,9 ± 0,2, que apesar de ter havido uma redução quando comparado com a Fase I, continuou sendo resposta da capacidade de tamponamento da etapa metanogênica (Figura 15b), apesar da redução na AP durante essa fase, com uma média de 969,7 ± 251 mg CaCO₃·L⁻¹. Estudos de codigestão de microalgas com lodo de esgoto desenvolvidos por Varol e Ugurlu (2016) alcançaram valores de pH um pouco maiores que este trabalho, em torno de 7,2 e 7,4, mas relataram que o parâmetro se manteve controlado devido a adição de solução alcalina quando encontrava-se inferior a 7,0.

Assim como nas Fases I e II, o pH do RM apresentou pouca variação na Fase III, apesar de ter sido apresentada uma tendência à diminuição no valor, com uma média em torno de 6,7 ± 0,1. Essa tendência de redução do pH no meio, pode ser resposta de uma adaptação da comunidade microbiana presente no reator que atuaram na produção de metano, uma vez que a

disponibilidade de AGV para o RM foi inferior, com concentrações próximas a 3000 mg. L⁻¹ que perduraram durante quase toda a Fase III, e redução de 73% na AP, com concentrações médias em torno de $1879,7 \pm 497$ mg CaCO₃·L⁻¹ na Fase I, para 507 ± 157 mg CaCO₃·L⁻¹ na Fase III. Esta condição infere que *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas podem ter atuado na produção de CH₄ consumindo bicarbonato (HCO₃⁻), ocasionando uma diminuição do pH e deixando o sistema mais vulnerável a essas mudanças devido ao consumo de bicarbonato (Equação 9), tendo em vista a sua importante característica de tamponamento do sistema (DELGADO et al., 2012).

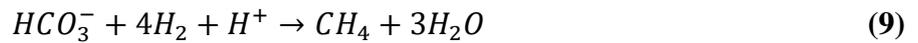
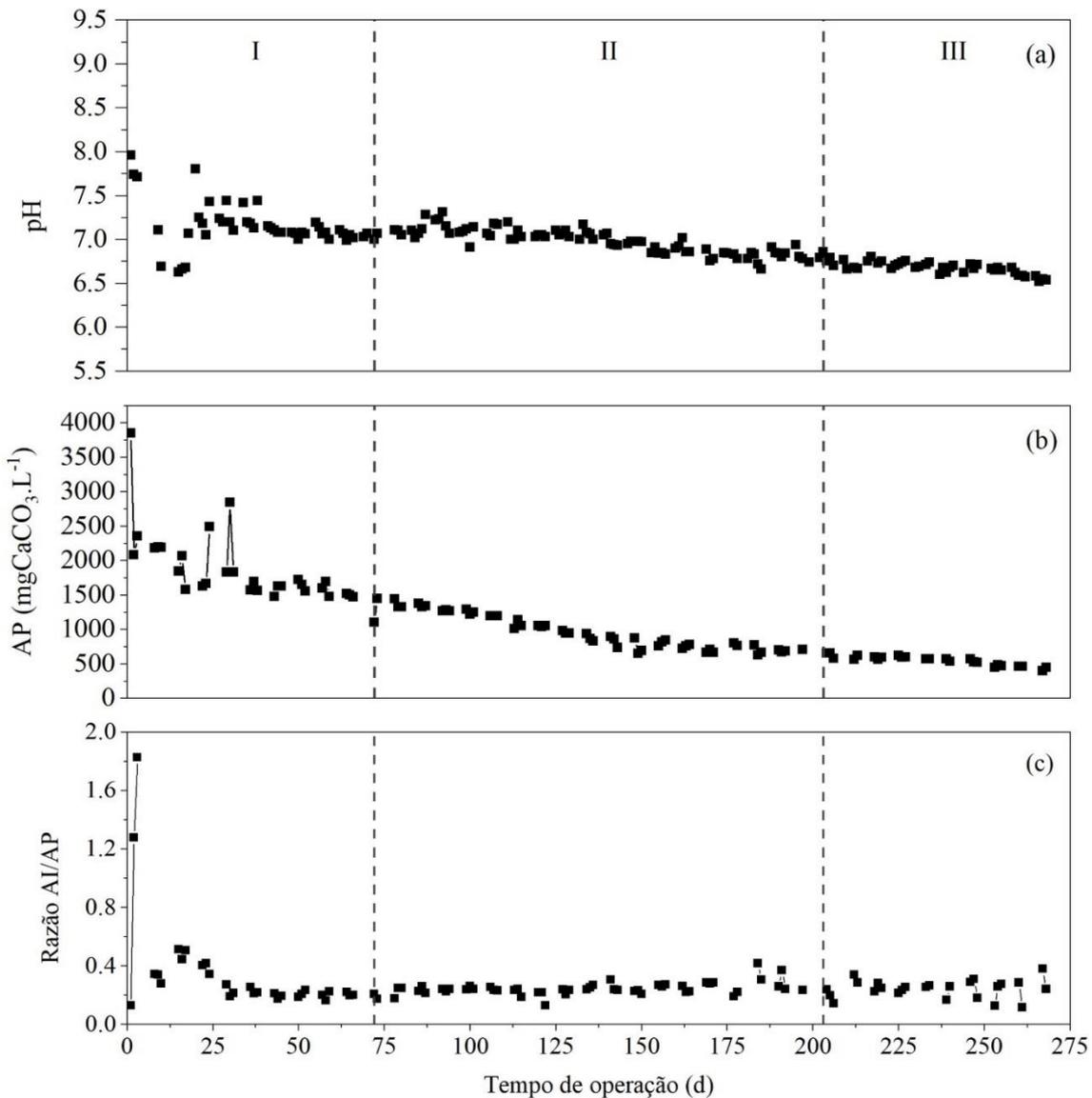


Figura 15 – Variáveis relacionadas à estabilidade do reator metanogênico: (a) pH. (b) alcalinidade parcial (AP) (c) razão alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial (AI/AP)



Fonte: a autora (2022).

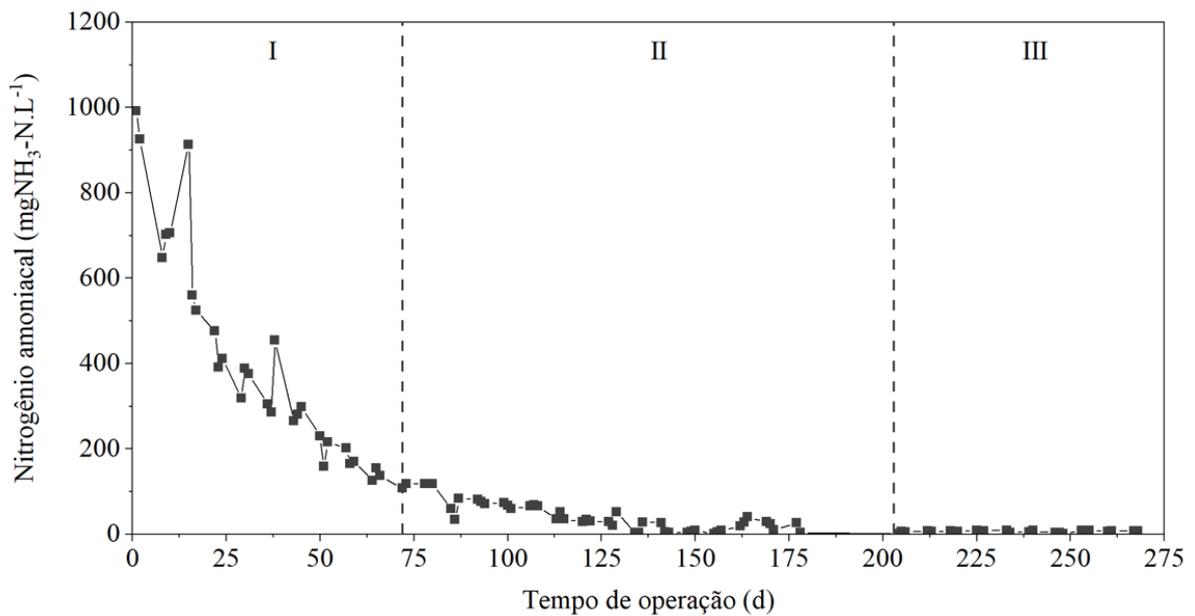
O RM apresentou uma operação relativamente estável em todas as fases experimentais, baseando-se na relação entre alcalinidade intermediária e parcial, AI/AP. Caracterizada pelo fato de ter havido uma redução da AT, além da AP, a fim de manter um controle para neutralizar os ácidos oriundos do RA.

A fase inicial de partida do reator apresentou relação AI/AP que variou entre 1,8 e 0,21, principalmente nos primeiros 30 dias (Figura 15c). Ainda que inoculado, o metabolismo metanogênico foi incipiente diante da oferta de substrato, ocasionando um acúmulo temporário de ácido acético (Figura 13). A continuidade do processo levou a seleção e crescimento de *archaeas* metanogênicas adaptadas ao substrato capazes de metabolizar o substrato equivalente à carga orgânica aplicada ao reator RM, aplicando constantemente uma COV de 0,25 kg DQO·m⁻³d⁻¹, o que proporcionou diminuição da relação AI/AP média para $0,21 \pm 0,02$.

Em termos comparativos, as Fases II e III, as quais foram conduzidas sob mesma COV e TDH, apresentaram relação AI/AP média $0,24 \pm 0,04$ e $0,25 \pm 0,06$, respectivamente. Infere-se, portanto, que a capacidade de neutralizar ácidos orgânicos no processo de codigestão foi similar à capacidade observada na digestão apenas de vinhaça. Embora uma diferença tenha sido observada, marcada pela redução significativa na alcalinidade parcial, ao longo das Fases II e III, e pontuais alterações na razão AI/AP (Figura 15b, c), o sistema apresentou estabilidade operacional mantendo valores para a razão AI/AP próximos a 0,3, considerado aproximadamente ideal para sistemas metanogênicos de alta taxa (RIPLEY et al., 1986).

A Figura 16 apresenta a concentração de nitrogênio amoniacal encontrada durante os três períodos experimentais.

Figura 16 – Concentração de nitrogênio amoniacal no reator metanogênico



Fonte: a autora (2022).

Observou-se que as concentrações desse parâmetro analisado foram mantidas na uma faixa inferior a $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de maneira geral, que são menores que o valor limite de inibição de $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ROMANO; ZHANG, 2008).

Na Fase I foram encontradas inicialmente concentrações próximas a $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguindo posteriormente uma tendência de redução. Valores baixíssimos encontrados nas Fases II e III, inferiores a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, condizem com a ideia de uma ótima atividade metanogênica na conversão dos ácidos, oriundos do RA, em biogás.

Essa variável tem efeito significativo sobre microrganismos metanogênicos. De acordo com Prochazka et al. (2020), deficiências em nitrogênio amoniacal, valores inferiores a $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, demonstraram causar baixos rendimentos de metano devido à baixa atividade microbiana e capacidade tampão, entretanto, apesar de serem evidenciados valores inferiores a essa faixa, não foi possível afetar a produção específica de metano.

A codigestão de esterco suíno e biomassa de microalgas, estudada por González-Fernández, Molinuevo-Salces e García-González, (2011) alcançou elevadas concentrações de N-NH_4^+ , cerca de $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, no período semelhante ao de maior rendimento de metano (valor da produção), ou seja, neste caso, o limite de concentração de amônia para impedir a atividade de *archaeas* metanogênicas foi considerado muito acima dos valores alcançados.

5.4.3 Desempenho do reator metanogênico na produção de metano

O reator metanogênico apresentou produção de metano desde o período de start-up, influenciado pela presença de comunidade metanogênica oriunda do lodo anaeróbio usado na inoculação (Figura 17). Na Fase I a produção média de metano foi $71 \pm 37 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, (média \pm desvio), alcançando valor máximo de $155 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, ao 24º dia operacional, após 1 TDH completo. Posteriormente, após um período de 3 TDHs foi verificada uma alta variação do rendimento de metano, com valores entre 50 e $100 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, com uma tendência à diminuição da produtividade alcançada anteriormente. Por esta razão, é possível associar esses resultados alcançados com a distribuição dos ácidos oriundos do RA observados no período final da Fase I, que apesar de estarem prontamente disponíveis para serem metabolizados pela comunidade microbiana presente no RM, o ácido acético encontrava-se com uma representatividade de 40% entre os AGV produzidos, enquanto anteriormente representavam quase 100% dos ácidos (Figura 13b).

Poucas investigações se concentraram na digestão de microalgas sob operação de alimentação semicontínua e, principalmente, em sistemas de dois estágios, portanto, estudos para fins de comparação são limitados.

Tena, Perez e Solera (2021b) ao estudarem o efeito do TDH e COV aplicados em sistemas de dois estágios de vinhaça e lodo de esgoto (50:50), operados em alimentação semicontínua, observaram rendimentos de metano próximos a $120,4 \pm 26,5 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQO}^{-1}_{\text{removida}}$, aplicando COV de $3,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e TDH de 20 dias, valores muito superiores à primeira etapa deste trabalho operando a digestão anaeróbia de vinhaça.

Ao analisar a Fase II, período de codigestão de BA:V (50:50), é possível observar para os primeiros 40 dias um decréscimo no rendimento de metano para $39 \pm 13 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$. Entretanto, de maneira geral, a Fase II obteve um rendimento médio de $85 \pm 63 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, e após o 150º dia de operação, rendimentos de metano 54% superiores aos valores encontrados nos dias anteriores, alcançando um rendimento máximo de $230 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, condizente com o aumento da produção de AGV observados no mesmo período.

Assim como Tena, Perez e Solera (2021b) outros resultados acerca de rendimento de metano foram relatados em sistemas de codigestão em dois estágios, como por Dareioti e Kornaros (2014, 2015) e Krishnan et al. (2016) os quais observaram 223,1, 316,1, e 320,0 $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g DQO}^{-1}_{\text{removida}}$, respectivamente. Diferenças significativas entre os estudos mencionados devem ser levadas em consideração, uma vez que eles foram conduzidos em condições termofílicas, diferentemente do presente trabalho, além de terem sido desenvolvidos com cargas

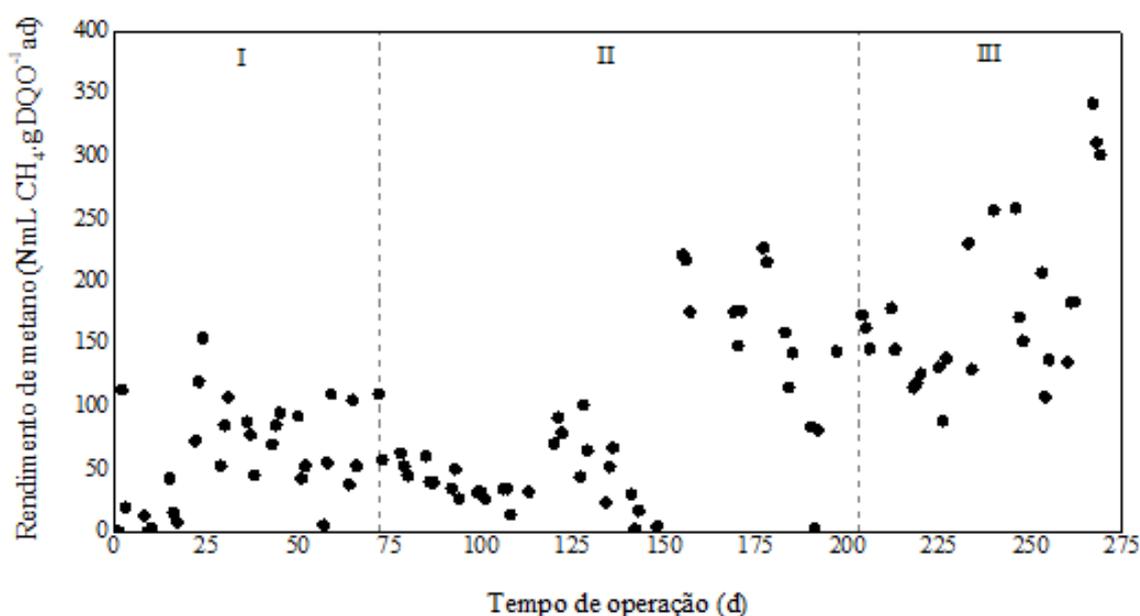
orgânicas volumétricas superiores, próximas a $4,0 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Outro ponto a ser considerado acerca da variação nos rendimentos de metano pode ser a influência da composição química dos substratos, tendo em vista que os produtos analisados nos estudos mencionados acima foram águas residuais, soro de queijo, estrume de vaca, sorgo ensilado e efluente de lagares de óleo de palma.

Estudos desenvolvidos em sistemas de estágio único por Baldi, Pecorini e Iannelli, (2019) e Ripoll et al. (2020) para codigestão de vinhaça e lodo de esgoto, resíduos alimentares e lodo de esgoto, respectivamente, alcançaram rendimentos máximos inferiores aos encontrados nesse trabalho, concluindo que a produção de metano foi maior em sistemas de dois estágios para diferentes resíduos.

Olsson et al. (2018) desenvolveram estudos para verificar a influência da codigestão com microalgas em sistemas de DA de lodo de esgoto a partir de experimentos batelada e semicontínuo, por meio da aplicação de diferentes TDH e COV, a fim de verificar o rendimento de metano. O experimento semicontínuo foi dividido em dois períodos, adotando um TDH de 15 dias e uma COV de $4,8 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e TDH de 20 dias e COV de $7,0 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, para os períodos I e II, respectivamente. Em ambas as condições testadas foi possível alcançar rendimentos em torno de $100 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$ e $85 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$. Dessa forma, pode-se observar que, mesmo adotando condições de alimentação que pudessem favorecer o rendimento de metano (períodos de COV e TDH favoráveis a DA), o presente trabalho conseguiu alcançar uma produção de metano superior aos resultados apresentados pelos autores, por utilizar um sistema de dois estágios além do processo de codigestão.

Llamas et al. (2021) utilizaram sistemas de dois estágios a fim de verificar uma recuperação de subprodutos a partir da digestão de microalgas. Foi relatado, uma vez que a biomassa de microalgas foi hidrolisada em reator acidogênico, rendimento médio de metano de $168,9 \pm 23,7 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, com base em uma aplicação de carga orgânica volumétrica de $1,5 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e TDH de 20 dias. Apesar dos autores terem relatado um rendimento superior, o presente trabalho alcançou valores semelhantes ao final da Fase II (Figura 17), mesmo adotando COV menores (83% inferior em relação ao estudo).

Figura 17 – Rendimento de metano por massa de DQO adicionada no reator metanogênico



Fonte: a autora (2022).

O reator metanogênico apresentou maiores produções de metano na Fase III. No geral, a terceira fase obteve um rendimento médio de $178 \pm 66 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, cerca de 109% e 150% maior que o resultado obtido nas Fases II e I, respectivamente. Além disso, é possível observar na Figura 17, um pico de rendimento correspondente ao dia 267, considerado o maior alcance de produção de metano, com $342 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, equivalente a 97% do total de metano recuperável estequiometricamente. Tendo em vista que houve uma solubilização de 16% da biomassa algal após o pré-tratamento hidrotérmico de autoclavagem, pode-se observar como esse mecanismo contribuiu para a obtenção de maiores rendimentos de metano para sistemas de codigestão com BA.

Pesquisas de digestão anaeróbia usando reatores operados em batelada e com e sem pré-tratamento térmico (em incubadora a 75°C , por 10h), Solé-Bundó et al., (2018) verificaram que a codigestão melhorou a cinética microbiana e proporcionou um melhor rendimento de metano. Os autores testaram a mistura de substrato 25:75 para biomassa algal e lodo de esgoto, e com relação aos testes em condições mesofílicas em reatores de estágio único, houve um alcance de rendimento de metano de $230 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$, valor aproximadamente 3 vezes maior comparado a DA de microalgas, que apesar do pré-tratamento térmico, resultou em baixo rendimento de metano ($80 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$). Tal como ocorrido com os autores, as melhores respostas em termos de rendimentos de metano na presente pesquisa foram positivamente

influenciadas pela aplicação de um sistema semicontínuo em dois estágios, e o tipo de pré-tratamento utilizado (térmico de autoclavagem).

A produção específica de metano obtida nesta pesquisa na Fase III é equivalente às aquelas obtidas em outros estudos conduzidos com técnicas alternativas de pré-tratamento, como o térmico e enzimático. Mendez et al. (2014) e Mahdy, Ballesteros e González-Fernández, (2016) relataram produção específica de metano entre 110 e 180 mL CH₄·gDQO⁻¹_{ad} quando a DA foi conduzida em modo contínuo em reatores CSTR de estágio único. Verifica-se, portanto, que a técnica empregada na presente pesquisa é eficaz para o incremento da solubilização do substrato no reator RA o que proporciona maior disponibilidade de substrato aos microrganismos metanogênicos no RM para convertê-los a metano.

5.4.4 Remoção de matéria orgânica

Os resultados obtidos dos sistemas de dois estágios (RA e RM), em termos de carga orgânica aplicada para cada reator são apresentados na Tabela 14, considerando uma média de cada fase experimental. Notadamente, a DQOt afluyente corresponde à carga aplicada para cada reator, a fim de atender às COV estabelecidas, COV de 5,62 kg DQO·m⁻³·d⁻¹ no RA e 0,25 kg DQO·m⁻³·d⁻¹ no RM.

Tabela 14 – Balanço de massa referente a carga orgânica aplicada para o sistema de dois estágios

Fase	Carga orgânica do substrato afluyente	Carga orgânica efluente do RA	Carga orgânica fermentado afluyente ao RM	Carga orgânica efluente do RM	Unidade
I	10,13	9,40	0,72	0,24	g
II	10,13	9,12	0,72	0,44	g
III	10,13	7,05	0,72	0,38	g

Fonte: a autora (2022).

Na Fase I, a eficiência média de remoção de DQO total do sistema foi de $7,2 \pm 1,5\%$ e $66,7 \pm 1,2\%$, para o RA e RM, respectivamente. Para a Fase II, a eficiência de remoção de DQOt no RA foi de 10% e para o RM foi 38,9%. Na Fase III, devido ao efeito do pré-tratamento, o alcance de eficiência de remoção no RA foi maior do que as Fases I e II, alcançando 30,4% e para o RM 47,2%.

O alcance da maior eficiência de remoção no RA na Fase III, corrobora com a ideia de que *archaeas* metanogênicas estavam abundantes nesse período, uma vez que houve redução nas concentrações de AGV nessa fase (Figura 13c), com uma menor predominância do ácido acético, representando uma predominância inferior a 10% nos AGV totais, contribuindo consequentemente, para a redução na eficiência no RM, tendo em vista que é esperado uma maior eficiência de remoção devido a influência do pré-tratamento.

A hipótese da presença de *archaeas* metanogênicas no RA e das demais comunidades microbianas presentes nos dois reatores será confirmada com os resultados do sequenciamento enviados após a extração de DNA.

6 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos no presente trabalho, foi possível observar, portanto, que o processo de codigestão de biomassa algal com vinhaça de cana-de-açúcar foi, de modo geral, bem-sucedida, permitindo estabilidade dos reatores em dois estágios e provocando uma maior eficiência. Além disso, partindo dos experimentos realizados em batelada, os valores alcançados para produção de metano na condição de (50:50) com base em DQO, foram superiores quando comparados com o experimento de digestão anaeróbia de BA. Portanto, a introdução da vinhaça foi benéfica, proporcionando inclusive, um índice de sinergia maior que 1, indicando que a condição testada resulta em um efeito sinérgico de 12%.

A produção de AGV na Fase I, período de digestão anaeróbia de vinhaça, obteve um rendimento crescente e estável dos AGV, sendo mais representativo quanto a presença do ácido acético. Com a adição de biomassa de algas, Fase II, a produção média de AGV apresentou maiores rendimentos, alcançando valores máximos de todo período experimental, entretanto causou alterações com relação a distribuição dos metabólitos e redução da produção em alguns momentos. O pré-tratamento da biomassa de algas resultou na menor produção de AGV no RA durante a Fase III, representando uma redução de aproximadamente 52% quando comparada com a Fase II.

A produção de metano na Fase I foi presente desde o start-up do sistema, mas bastante instável, oriunda de alimentação com menor distribuição de ácido acético ao longo da etapa. A adição de biomassa de algas, Fase II, provocou um aumento na produção média de metano. O pré-tratamento da biomassa de algas resultou em maior produção de metano no RM durante todas as condições testadas ao longo dos 270 dias (Fases I, II e III), com valores máximos de $342 \text{ NmL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{ad}}$. Apesar disso, nesta fase a produção de metano no RM foi prejudicada pelo aparente metabolismo metanogênico ocorrido no RA, resultando em menor disponibilidade de AGV para conversão à metano no RM.

Verificou-se, portanto, que um sistema de reatores de dois estágios pode ser conduzido para valorização de resíduos orgânicos de difícil biodegradabilidade, como a biomassa de microalgas. A codigestão com vinhaça proporciona maior equilíbrio nutricional, enquanto a separação das fases reacionais favorece a formação de AGV e a sua conversão a metano. Além disso, o pré-tratamento físico da biomassa de microalgas impulsionou as reações metanogênicas visto que as maiores produções de metano foram obtidas nesta situação.

Portanto, este trabalho fornece conhecimentos para produção de energia renovável e fomenta o alcance do desenvolvimento sustentável, auxiliando na redução das lacunas

existentes acerca dos projetos que visam reduzir os impactos negativos presentes na sociedade atual, assim como oferta conhecimento de qualidade para o setor industrial a fim de construir infraestrutura resiliente, promover a industrialização inclusiva e sustentável, e fomentar a inovação.

7 RECOMENDAÇÕES

Após o estudo desenvolvido e das constatações feitas, futuras investigações são recomendadas por meio de pontos técnicos/científicos:

- 1) Realizar estudos acerca da dinâmica microbiana para relacionar o metabolismo existente com os resultados alcançados;
- 2) Avaliar a possibilidade de utilizar outros tipos de pré-tratamentos a fim de verificar se há benefícios com relação a produção de AGV assim como de rendimento de metano;
- 3) Avaliar a possibilidade de testar outros substratos que possam substituir a vinhaça, principalmente nos períodos de entressafra, ou serem utilizados em conjunto com a vinhaça e biomassa algal;
- 4) Variar condições operacionais, tais como TDH, COV, temperatura, agitação etc., utilizando as proporções otimizadas, para verificar o efeito destas variáveis no rendimento de metano e estabilidade dos reatores;
- 5) Avaliar o potencial da mistura biomassa algal e vinhaça para produção de gás metano e hidrogênio compatível com bioetano;
- 6) Otimizar condições operacionais para avaliar o alcance de outros subprodutos como os PHA a partir dos AGV produzidos.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 1 nov. 2011.
- AJEEJ, A. et al. An overview of bio augmentation of methane by anaerobic co-digestion of municipal sludge along with microalgae and waste paper. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 270–276, 1 out. 2015.
- 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, 1 nov. 2012.
- 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, jan. 1993.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. [s.d.].
- APHA, AWWA, and WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 25th ed. Baltimore: Port City Press, 2017.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- ATELGE, M. R. et al. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, 15 jun. 2020.
- AYALA-PARRA, P. et al. Nutrient recovery and biogas generation from the anaerobic digestion of waste biomass from algal biofuel production. **Renewable Energy**, v. 108, p. 410–416, 1 ago. 2017.
- AYDIN, S. et al. Rumen anaerobic fungi create new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass. **Algal Research**, v. 23, p. 150–160, 1 abr. 2017.
- BALDI, F.; PECORINI, I.; IANNELLI, R. Comparison of single-stage and two-stage anaerobic co-digestion of food waste and activated sludge for hydrogen and methane production. **Renewable Energy**, v. 143, p. 1755–1765, 1 dez. 2019.
- BARRAGÁN-TRINIDAD, M.; CARRILLO-REYES, J.; BUITRÓN, G. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 100–107, 1 nov. 2017.
- BAUMANN, I.; WESTERMANN, P. **Microbial Production of Short Chain Fatty Acids from Lignocellulosic Biomass: Current Processes and Market**. **BioMed Research International**Hindawi Limited, , 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BOHUTSKYI, P.; BETENBAUGH, M. J.; BOUWER, E. J. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 366–372, 1 mar. 2014.

BOHUTSKYI, P.; BOUWER, E. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: A review, analysis, and research needs. **Advanced Biofuels and Bioproducts**, v. 9781461433484, p. 873–975, 1 jan. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília: MMA, ago. 2012. p. 72.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. 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, 1 fev. 2010.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 1–4, p. 315–331, 15 maio 1997.

CARRÈRE, H. et al. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1–3, p. 1–15, 15 nov. 2010.

CARRILLO-REYES, J. et al. Thermophilic biogas production from microalgae-bacteria aggregates: biogas yield, community variation and energy balance. **Chemosphere**, v. 275, p. 129898, 1 jul. 2021.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462–1476, 1 abr. 2012.

CHEN, P. H.; OSWALD, W. J. Thermochemical treatment for algal fermentation. **Environment International**, v. 24, n. 8, p. 889–897, 1 nov. 1998.

CHENG, H. H. et al. Biological hydrogen and methane production from bagasse bioethanol fermentation residues using a two-stage bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 49–55, 1 jun. 2016.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 1 abr. 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol. Adv.**, v. 25, p. 294–306, 2007.

CHO, H. U. et al. Influence of temperature on volatile fatty acid production and microbial community structure during anaerobic fermentation of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 475–480, 1 set. 2015.

CHO, S. et al. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 515–520, 1 mar. 2013.

CIRNE, D. G. et al. Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. **Renewable Energy**, v. 32, n. 6, p. 965–975, 1 maio 2007.

COELHO, S. T. et al. Brazilian sugarcane ethanol: lessons learned. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, n. 2, p. 26–39, 1 jun. 2006.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, 2020.

DAREIOTI, M. A.; KORNAROS, M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 407–415, 1 set. 2014.

DAREIOTI, M. A.; KORNAROS, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a two-stage CSTR system: Effect of hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 553–562, 1 jan. 2015.

DAVID BOLZONELLA, *, † FRANCESCO FATONE, † PAOLO PAVAN, ‡ AND FRANCO CECCHI†. Anaerobic Fermentation of Organic Municipal Solid Wastes for the Production of Soluble Organic Compounds. [s.d.].

DELGADO, A. G. et al. Role of bicarbonate as a pH buffer and electron sink in microbial dechlorination of chloroethenes. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 13 set. 2012.

DI MARIA, F. et al. Solid anaerobic digestion batch with liquid digestate recirculation and wet anaerobic digestion of organic waste: Comparison of system performances and identification of microbial guilds. **Waste Management**, v. 59, p. 172–180, 1 jan. 2017.

DO CARMO, D. L.; SILVA, C. A. Métodos de quantificação de carbono e matéria orgânica em resíduos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 4, p. 1211–1220, 2012.

DONOSO-BRAVO, A. et al. Assessment of the influence of thermal pre-treatment time on the macromolecular composition and anaerobic biodegradability of sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 660–666, 1 jan. 2011.

DONOSO-BRAVO, A. et al. Addressing the synergy determination in anaerobic co-digestion and the inoculum activity impact on BMP test. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 80, n. 2, p. 387–396, 15 jul. 2019.

DUGBA, P. N.; ZHANG, R. Treatment of dairy wastewater with two-stage anaerobic sequencing batch reactor systems — thermophilic versus mesophilic operations. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 3, p. 225–233, 1 jun. 1999.

ENG SÁNCHEZ, F. et al. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, p. 119378, 15 fev. 2021.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94–105, 1 ago. 2015.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, 1 dez. 2014.

Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1108617/fundamentos-da-digestao-anaerobia-purificacao-do-biogas-uso-e-tratamento-do-digestato>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

GANESH SARATALE, R. et al. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 319–332, 1 ago. 2018.

GARRITY, G. M. et al. Phylum “Crenarchaeota” Garrity and Holt. p. 4, 2007.

GHOSH, S.; OMBREGT, J. P.; PIPYN, P. Methane production from industrial wastes by two-phase anaerobic digestion. **Water Research**, v. 19, n. 9, p. 1083–1088, 1 jan. 1985.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic digestion of Algae. **Applied microbiology**, v. 5, n. 1, p. 47–55, jan. 1957.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 219–223, 1 fev. 2013.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; MOLINUEVO-SALCES, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3448–3453, 1 out. 2011.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S. et al. Embedding environmental, economic and social indicators in the evaluation of the sustainability of the municipalities of Galicia (northwest of Spain). **Journal of Cleaner Production**, v. 234, p. 27–42, 10 out. 2019.

GOTTARDO, M. et al. Pilot scale fermentation coupled with anaerobic digestion of food waste - Effect of dynamic digestate recirculation. **Renewable Energy**, v. 114, p. 455–463, 1 dez. 2017.

GUPTA, P. Integration of microalgal cultivation system for wastewater remediation and sustainable biomass production. [s.d.].

- HARIRCHI, S. et al. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>, v. 13, n. 3, p. 6521–6557, 2022.
- KAPOOR, R. et al. Evaluation of biogas upgrading technologies and future perspectives: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p. 11631–11661, 15 mar. 2019.
- KIANI DEH KIANI, M. et al. Different bioreactor configurations for biogas production from sugarcane vinasse: A comprehensive review. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, p. 106446, 1 jun. 2022.
- KIM, D. H. et al. Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8646–8652, 1 set. 2011.
- KIM, J. K. et al. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 328–332, 1 out. 2006.
- KIM, N. K. et al. Current understanding and perspectives in anaerobic digestion based on genome-resolved metagenomic approaches. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126350, 1 jan. 2022.
- KONG, D. et al. Methanogenic community during the anaerobic digestion of different substrates and organic loading rates. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, p. e00709, 1 maio 2019.
- KOSTER, I. W.; LETTINGA, G. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. **Agricultural Wastes**, v. 9, n. 3, p. 205–216, 1 jan. 1984.
- KRISHNAN, S. et al. Process enhancement of hydrogen and methane production from palm oil mill effluent using two-stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 30, p. 12888–12898, 10 ago. 2016.
- KUMAR, R.; 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, 1 fev. 2009.
- KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 491–500, 1 jun. 2014.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89–101, nov. 2012.
- LEE, D. Y. et al. Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S42–S47, 1 jan. 2010.

- LEE, W. S. et al. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 83–99, 1 jan. 2014.
- LI, R. et al. Co-digestion of chicken manure and microalgae *Chlorella* 1067 grown in the recycled digestate: Nutrients reuse and biogas enhancement. **Waste Management**, v. 70, p. 247–254, 1 dez. 2017.
- LI, Y.; KHOR, K. A. Mechanical properties of the plasma-sprayed Al₂O₃/ZrSiO₄ coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 150, n. 2–3, p. 143–150, 15 fev. 2002.
- LLAMAS, M. et al. Tuning microbial community in non-conventional two-stage anaerobic bioprocess for microalgae biomass valorization into targeted bioproducts. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125387, 1 out. 2021.
- MAGDALENA, J. A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Archaea inhibition: Strategies for the enhancement of volatile fatty acids production from microalgae. **Waste Management**, v. 102, p. 222–230, 1 fev. 2020.
- MAHDY, A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Enzymatic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for biogas production: Influence of urban wastewater as a sole nutrient source on macromolecular profile and biocatalyst efficiency. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 319–325, 1 jan. 2016.
- MAO, C. et al. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 1 maio 2015.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 1 jan. 2010.
- METCALF & EDDY, Boston; TCHOBANOGLOUS, George. **Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse**. Central Book Company, 2006.
- MENDEZ, L. et al. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. **Applied Energy**, v. 129, p. 238–242, 15 set. 2014.
- MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167–173, 1 jun. 2014.
- MICOLUCCI, F. et al. Pilot-scale multi-purposes approach for volatile fatty acid production, hydrogen and methane from an automatic controlled anaerobic process. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, p. 124297, 20 dez. 2020.
- MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 1 abr. 2015.

- MOREIRA, J. R. Sugarcane for energy – recent results and progress in Brazil. **Energy for Sustainable Development**, v. 4, n. 3, p. 43–54, 1 out. 2000.
- MORGENROTH, E.; KOMMEDAL, R.; HARREMOËS, P. Processes and modeling of hydrolysis of particulate organic matter in aerobic wastewater treatment – a review. **Water Science and Technology**, v. 45, n. 6, p. 25–40, 1 mar. 2002.
- NAGAO, N. et al. Maximum organic loading rate for the single-stage wet anaerobic digestion of food waste. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 210–218, 1 ago. 2012.
- NESHAT, S. A. et al. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 308–322, 1 nov. 2017.
- OLSSON, J. et al. Anaerobic co-digestion of sludge and microalgae grown in municipal wastewater – a feasibility study. **Water Science and Technology**, v. 77, n. 3, p. 682–694, 12 fev. 2018.
- OLSSON, L.; FALLDE, M. Waste(d) potential: a socio-technical analysis of biogas production and use in Sweden. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 107–115, 1 jul. 2015.
- OSWALD, W. J.; GOLUEKE, C. G. Biological Transformation of Solar Energy. **Advances in Applied Microbiology**, v. 2, n. C, p. 223–262, 1 jan. 1960.
- PAKARINEN, O. M.; TÄHTI, H. P.; RINTALA, J. A. One-stage H₂ and CH₄ and two-stage H₂ + CH₄ production from grass silage and from solid and liquid fractions of NaOH pre-treated grass silage. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 10, p. 1419–1427, 1 out. 2009.
- PASSOS, F. et al. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 403–412, 1 nov. 2014.
- PASSOS, F.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 79–86, 1 jun. 2013.
- PASSOS, F.; ORTEGA, V.; DONOSO-BRAVO, A. Thermochemical pretreatment and anaerobic digestion of dairy cow manure: Experimental and economic evaluation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 239–246, 1 mar. 2017.
- PAUDEL, S. et al. Effect of volumetric organic loading rate (OLR) on H₂ and CH₄ production by two-stage anaerobic co-digestion of food waste and brown water. **Waste Management**, v. 61, p. 484–493, 1 mar. 2017.
- PRAJAPATI, S. K. et al. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1408–1425, 1 dez. 2013.

PRAJAPATI, S. K. et al. Bioconversion of algae to methane and subsequent utilization of digestate for algae cultivation: A closed loop bioenergy generation process. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 174–180, 1 abr. 2014.

RAPOSO, F. et al. Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation. **Chemical Engineering Journal**, v. 149, n. 1–3, p. 70–77, 1 jul. 2009.

REGUEIRA, A. et al. A metabolic model for targeted volatile fatty acids production by cofermentation of carbohydrates and proteins. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 122535, 1 fev. 2020.

RIPLEY, L. et al. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **JSTOR**, [s.d.].

RIPOLL, V. et al. Modelling of the anaerobic semi-continuous co-digestion of sewage sludge and wine distillery wastewater. **pubs.rsc.org**, [s.d.].

RODRIGUEZ, C. et al. Waste paper and macroalgae co-digestion effect on methane production. **Energy**, v. 154, p. 119–125, 1 jul. 2018.

ROMANO, R. T.; ZHANG, R. Co-digestion of onion juice and wastewater sludge using an anaerobic mixed biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 631–637, 1 fev. 2008.

RYCKEBOSCH, E.; DROUILLON, M.; VERVAEREN, H. Techniques for transformation of biogas to biomethane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1633–1645, 1 maio 2011.

SCHIEVANO, A. et al. Two-Stage vs Single-Stage Thermophilic Anaerobic Digestion: Comparison of Energy Production and Biodegradation Efficiencies. 2012.

SCHIEVANO, A. et al. Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? **Applied Energy**, v. 124, p. 335–342, 1 jul. 2014.

SCHWEDE, S. et al. Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 505–511, 1 set. 2013.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 409–416, 1 jul. 2009.

SIDDIQUE, M. N. I.; WAHID, Z. A. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 194, p. 359–371, 1 set. 2018.

SOLÉ-BUNDÓ, M. et al. Strategies to Optimize Microalgae Conversion to Biogas: Co-Digestion, Pretreatment and Hydraulic Retention Time. **Molecules** 2018, Vol. 23, Page 2096, v. 23, n. 9, p. 2096, 21 ago. 2018.

- SOLÉ-BUNDÓ, M. et al. Co-digestion of microalgae and primary sludge: Effect on biogas production and microcontaminants removal. **Science of the Total Environment**, v. 660, p. 974–981, 10 abr. 2019a.
- SOLÉ-BUNDÓ, M. et al. Co-digestion strategies to enhance microalgae anaerobic digestion: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 112, p. 471–482, 1 set. 2019b.
- SOOBHANY, N. Insight into the recovery of nutrients from organic solid waste through biochemical conversion processes for fertilizer production: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 241, p. 118413, 20 dez. 2019.
- STRAZZERA, G. et al. Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 226, p. 278–288, 15 nov. 2018.
- SUN, L. et al. Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 815–827, 1 set. 2015.
- SURESH, A. et al. Improved volatile fatty acid and biomethane production from lipid removed microalgal residue (LR μ AR) through pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 590–594, 1 dez. 2013.
- SZYMANSKI, Mariani Silvia Ester; BALBINOT, Rafaelo; SCHIRMER, Waldir Nagel. Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono—estudo de caso. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 901–911, 2010.
- TENA, M.; PEREZ, M.; SOLERA, R. Effect of hydraulic retention time on hydrogen production from sewage sludge and wine vinasse in a thermophilic acidogenic CSTR: A promising approach for hydrogen production within the biorefinery concept. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 11, p. 7810–7820, 11 fev. 2021a.
- TENA, M.; PEREZ, M.; SOLERA, R. Effect of hydraulic retention time on the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion system from sewage sludge and wine vinasse: Microbial and kinetic evaluation. **Fuel**, v. 296, p. 120674, 15 jul. 2021b.
- THORIN, E. et al. Co-digestion of sewage sludge and microalgae – Biogas production investigations. **Applied Energy**, v. 227, p. 64–72, 1 out. 2018.
- TIAN, H. et al. Acclimation to extremely high ammonia levels in continuous biomethanation process and the associated microbial community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 616–623, 1 jan. 2018.
- TIJANI, H.; ABDULLAH, N.; YUZIR, A. Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1610–1622, 1 dez. 2015.

VALENTINO, F. et al. Enhancing volatile fatty acids (VFA) production from food waste in a two-phases pilot-scale anaerobic digestion process. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 106062, 1 out. 2021.

VAROL, A.; UGURLU, A. Biogas Production from Microalgae (*Spirulina platensis*) in a Two Stage Anaerobic System. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 1, p. 193–200, 1 fev. 2016.

VENTORINO, V. et al. Pre-treatment and inoculum affect the microbial community structure and enhance the biogas reactor performance in a pilot-scale biodigestion of municipal solid waste. **Waste Management**, v. 73, p. 69–77, 1 mar. 2018.

WAINAINA, S. et al. Resource recovery and circular economy from organic solid waste using aerobic and anaerobic digestion technologies. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122778, 1 abr. 2020.

WANG, M. et al. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 585–590, 1 ago. 2013.

WARD, A. J.; LEWIS, D. M.; GREEN, F. B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. **Algal Research**, v. 5, n. 1, p. 204–214, 1 jul. 2014.

WEI, Y. et al. Mesophilic anaerobic co-digestion of cattle manure and corn stover with biological and chemical pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 431–436, 1 dez. 2015.

WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 849–860, 2010.

WESTERHOLM, M.; DIGESTION, A. S.-A.; 2019, UNDEFINED. Microbial responses to different operating practices for biogas production systems. **books.google.com**, [s.d.].

XIAO, Y. et al. Alleviating nutrient imbalance of low carbon-to-nitrogen ratio food waste in anaerobic digestion by controlling the inoculum-to-substrate ratio. **Bioresource Technology**, v. 346, p. 126342, 1 fev. 2022.

XU, R. et al. Organic loading rate and hydraulic retention time shape distinct ecological networks of anaerobic digestion related microbiome. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 184–193, 1 ago. 2018.

YADAV, M. et al. Organic waste conversion through anaerobic digestion: A critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. **Metabolic Engineering**, v. 69, p. 323–337, 1 jan. 2022.

YEN, H. W.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 130–134, 1 jan. 2007.

ZALA, M. et al. Experimental investigation on anaerobic co-digestion of food waste and water hyacinth in batch type reactor under mesophilic condition. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 3, p. 707–714, 1 set. 2020.

ZHANG, L.; LOH, K. C.; ZHANG, J. Enhanced biogas production from anaerobic digestion of solid organic wastes: Current status and prospects. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 280–296, 1 fev. 2019.

ZHANG, Y.; BANKS, C. J. Impact of different particle size distributions on anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. **Waste Management**, v. 33, n. 2, p. 297–307, 1 fev. 2013.

ZHEN, G. et al. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 332–341, 1 set. 2016.

ZHOU, M. et al. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 68–78, 1 jan. 2018.