



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO**  
**SUSTENTÁVEL**

**ANA BEATRIZ LOBO MOREIRA**

**INFLUÊNCIA DE COAGULANTES NA GERAÇÃO DE BIOMETANO ATRAVÉS DA**  
**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA MICROALGÁCEA**

VITÓRIA – ES  
2018

**ANA BEATRIZ LOBO MOREIRA**

**INFLUÊNCIA DE COAGULANTES NA GERAÇÃO DE BIOMETANO ATRAVÉS DA  
DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA MICROALGÁCEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável (Modalidade Profissional) da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, área de concentração em Saneamento Ambiental e Saúde Pública.

Orientador: Prof. PhD. Sérgio Túlio Alves Cassini

VITÓRIA – ES  
2018

THE GREATER THE POWER,  
THE MORE DANGEROUS THE ABUSE.

**EDMUND BURKE**

## RESUMO

A produção de biocombustíveis através da digestão anaeróbia de microalgas é uma alternativa para os problemas ambientais e uso desenfreado de combustíveis fósseis. Porém, uma das etapas mais caras e desafiadoras é a recuperação da biomassa de microalgas. Um dos métodos mais indicados é a Coagulação-Floculação. O objetivo desta pesquisa é verificar a influência de coagulantes usados na recuperação da biomassa microalgácea na produção de biometano. As microalgas foram cultivadas em cinco (5) fotobiorreatores com inóculo de *Chlorella* sp. doado pelo Laboratório de Saneamento (UFES) e efluente de tratamento de esgoto doméstico da ETE Araçás. O cultivo durou 8 (oito) dias em ambiente externo e regime diurno/noturno com aeração artificial. Na recuperação da biomassa foram utilizados os coagulantes sulfato de alumínio, amido catiônico de mandioca e tanino em doses de 80 mg/L. A biomassa obtida por sedimentação natural foi o controle negativo. Os ensaios de biodigestão foram realizados no AMPTS II, da Bioprocess Control (Suécia). A recuperação com os coagulantes gerou biomassas com composições orgânicas heterogêneas. O ensaio de produção de biometano sem hidrólise durou 33 dias e a produção de biometano foi similar entre as biomassas coaguladas com amido, sulfato de alumínio e obtida pela sedimentação natural. A biomassa coagulada com tanino mostrou maior rendimento de biometano do que as demais (120,4 mL CH<sub>4</sub> / g SV). O ensaio após a hidrólise alcalina durou 19 dias e todos os tratamentos apresentaram-se diferentes entre si. A biomassa coagulada com amido apresentou maior rendimento de biometano (107,8 mL CH<sub>4</sub> / g SV) e também o maior percentual de aumento em relação à biomassa não hidrolisada (98,8%). A redução no rendimento de biometano nas biomassas coaguladas com tanino (-56,1%) e sulfato de alumínio (-27,8%) sugerem que tanto o coagulante, como a hidrólise podem influenciar na digestão anaeróbia. Por fim, a biomassa não hidrolisada coagulada com tanino e a biomassa hidrolisada coagulada com amido mostraram melhor rendimento de biometano do que as demais e quando comparadas com a sedimentação natural sem adição de coagulantes.

**Palavras-chave:** microalgas, floculação, digestão anaeróbia, biometano.

## ABSTRACT

Biofuel production by anaerobic digestion of microalgae is an alternative to environmental problems and unrestrained use of fossil fuels. However, the hardest challenging stages is the recovery of microalgae biomass. One of the most common method to recovery microalgae biomass is Coagulation-Flocculation. This research aims to verify the influence of coagulants employed in the recovery of microalgae biomass in the production of biomethane. Microalgae was cultivated on five (5) photobioreactors that were inoculated with *Chlorella* sp. donated by the Laboratório de Saneamento (UFES) and filled with domestic sewage treatment effluent from Araçás WWTP, Vitória, Brazil. The cultivation lasted 8 (eight) days, at external environment and day/night regime with artificial aeration. In the recovery of the biomass the coagulants aluminum sulfate, cationic cassava starch and tannin were added to microalgae in doses of 80 mg/L. Biomass obtained by natural sedimentation was the negative control. Biodigestion assays were performed on AMPTS II, from Bioprocess Control (Sweden). The recovery by distinct coagulants produced heterogeneous organic composition biomass. Biomethane yield assay without hydrolysis lasted 33 days and the biomethane production was similar on biomass flocculated with starch, aluminum sulphate and by natural settling. Tannin based biomass showed a higher yield of biomethane than others (120.4 mL CH<sub>4</sub> / g SV). The assay after alkaline pretreatment lasted 19 days and all treatments were different from each other. Cationic Starch was the biomass that presented the highest biomethane yield (107.8 mL CH<sub>4</sub> / g SV) and the highest increase percentage in the ratio of the untreated biomass (98.8%). Biomethane decreasing on pretreated tannin flocculated biomass (-56.1%) and aluminum sulphate (-27.8%) suggests that coagulant, as hydrolysis itself may influence the anaerobic digestion. Finally, untreated tannin flocculated biomass and pretreated flocculated starch biomass showed a better biomethane yield than the other flocculated biomass and when compared to natural settling biomass without addition of any coagulant.

**Keywords:** *microalgae, flocculation, anaerobic digestion, biomethane.*

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AME** – Atividade Metanogênica Específica

**BMA** – Biomassa microalgácea

**BMA SN** – Biomassa sedimentada naturalmente

**BMA AC** – Biomassa coagulada com amido catiônico de mandioca

**BMA TM** - Biomassa coagulada com tanino modificado

**BMA AS** - Biomassa coagulada com sulfato de alumínio

**BMA SNH** - Biomassa sedimentada naturalmente e hidrolisada

**BMA ACH** – Biomassa coagulada com amido catiônico de mandioca e hidrolisada

**BMA TMH** - Biomassa coagulada com tanino modificado e hidrolisada

**BMA ASH** - Biomassa coagulada com sulfato de alumínio e hidrolisada

**CFS** – Coagulação – Flocculação – Sedimentação

**DA** – Digestão Anaeróbia

**DQO** – Demanda Química de Oxigênio

**DBO** – Demanda bioquímica de oxigênio

**DO** – Densidade Óptica

**LD** – Lodo anaeróbio de tratamento de esgoto

**LDA** - Lodo anaeróbio de tratamento de esgoto com Acetato de sódio

**SV** – Sólidos Voláteis

**ST** – Sólidos Totais

**SVT** – Sólidos Voláteis Totais

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ENERGIAS RENOVÁVEIS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL</b> .....	<b>9</b>
3.1	A BIOMASSA MICROALGÁCEA COMO FONTE DE ENERGIA RENOVÁVEL .....	10
<b>3.1.1</b>	<b>Sobre as Microalgas</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1.2</b>	<b>O Cultivo de Microalgas para Produção de Biocombustíveis</b> .....	<b>12</b>
3.2	RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGÁCEA.....	17
<b>3.2.1</b>	<b>Tipos de Coagulantes</b> .....	<b>19</b>
3.3	PRÉ-TRATAMENTOS NA BIOMASSA MICROALGÁCEA.....	22
3.4	A DIGESTÃO ANAERÓBIA DA BIOMASSA MICROALGÁCEA PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS .....	27
<b>3.4.1</b>	<b>Quantificação de Biometano</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1	CULTIVO DAS MICROALGAS .....	33
<b>4.1.1</b>	<b>Preparo dos Inóculos</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Crescimento em Fotobiorreatores</b> .....	<b>33</b>
4.2	RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA.....	36
4.3	PRÉ-TRATAMENTO.....	38
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA .....	38
4.5	A PRODUÇÃO DE BIOMETANO ATRAVÉS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1	CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS .....	42
5.2	PRODUÇÃO DE BIOMETANO DA BIOMASSA COAGULADA SEM PRÉ-TRATAMENTO.....	46
5.3	PRODUÇÃO DE BIOMETANO DA BIOMASSA COAGULADA E HIDROLISADA.....	50
5.4	BIOMASSA SEM PRÉ-TRATAMENTO <i>VERSUS</i> PRÉ-TRATADA .....	55
5.5	A ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA .....	62
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por energia, o aumento da poluição e redução das reservas de petróleo (MUSSGNUG *et al.*, 2010) aumentaram a procura por fontes de energias renováveis, menos poluentes e economicamente viáveis (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011a). Uma destas alternativas são biocombustíveis produzidos a partir de microalgas, que são microrganismos ricos em compostos orgânicos (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009; UMMALYMA *et al.*, 2017).

O uso de microalgas na produção de biocombustíveis é vantajoso em diversos aspectos, como sua alta taxa de crescimento, eficiência fotossintética (LI *et al.*, 2008; GANESHKUMAR *et al.*, 2018) e crescimento em águas residuárias (GUPTA *et al.*, 2018). Desta forma, o cultivo de microalgas atua, em partes, no tratamento de esgoto sanitário e na geração de bioenergia através da produção de biometano (CAI; PARK; LI, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015a).

O biometano, principal componente do biogás, é produzido através da digestão anaeróbia de compostos orgânicos e é uma alternativa de baixo custo operacional que tem ganhado interesse como fonte energética (CÓRDOVA *et al.*, 2018; SRINUAPAN *et al.*, 2018). Contudo, há muitos desafios no uso das microalgas como fonte de energia, especialmente a separação da biomassa do meio de cultivo (CASSINI *et al.*, 2017).

Uma técnica eficiente e de baixo custo para a recuperação de microalgas é a coagulação-floculação-sedimentação (MOLINA-GRIMA *et al.*, 2003; SINGH & PATIDAR, 2018). Contudo, as suas principais limitações se devem ao tamanho reduzido das células das microalgas, sua diluição no meio de cultivo, a superfície negativa de sua parede celular e à densidade celular similar a da água (LI *et al.*, 2008; CHOY *et al.*, 2018). Molina-Grima *et al.* (2003) afirma que uma coagulação ideal deve ser realizada utilizando coagulantes baratos, não-tóxicos e que sejam efetivos mesmo em baixas concentrações.

Dependendo da natureza do coagulante, a biomassa pode ser contaminada e se tornar inviável para uso (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015a) e até inibir a produção de biometano (ANTHONY *et al.*, 2013). Por isso, o aprimoramento de técnicas, etapas e produtos tem contribuído para que seja economicamente viável a produção de biocombustíveis a partir de microalgas (PILLI *et al.*, 2011). Afinal, as microalgas são fontes de energia renovável promissoras e, mesmo que as pesquisas com estes microrganismos estejam dando seus passos iniciais, as perspectivas são otimistas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência de coagulantes utilizados para a recuperação de biomassa microalgácea na produção de biometano através da digestão anaeróbia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a biomassa cultivada em efluente de tratamento anaeróbio de esgoto doméstico recuperada através de diferentes coagulantes,
- Verificar o efeito de pré-tratamento alcalino na biomassa e na geração de biometano,
- Avaliar a produção de biometano em biomassa recuperada por meio da coagulação-floculação com agentes químicos e naturais.

### 3 ENERGIAS RENOVÁVEIS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

A demanda energética mundial teve seu ápice durante a Revolução Industrial no século XVIII e continua crescendo (ELRAYIES, 2018). Com isso, as reservas de combustíveis fósseis reduziram, provocando aumento nos valores da energia e problemas ambientais graves. Esse quadro deixa uma das maiores incertezas da humanidade: Como garantir suprimento energético e um meio ambiente saudável para as futuras gerações? (MUSSGNUG *et al.*, 2010).

Cerca de 88% da demanda energética mundial é atendida pelos combustíveis fósseis, por isso, a diversificação das fontes de energia é uma necessidade (BHARATHIRAJA *et al.*, 2018). Os biocombustíveis são uma alternativa ecológica para esta mudança (MATA, MARTINS; CAETANO, 2010), mesmo que ainda haja dificuldades e desafios a serem vencidos e solucionados. Apesar do alto custo de produção dos biocombustíveis e o baixo rendimento ainda serem a principal barreira para sua popularização, seu uso tem aumentado (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011a).

Mata, Martins e Caetano (*op. cit.*) enfatizam que o desenvolvimento de fontes de energia limpa é uma característica intrínseca ao desenvolvimento econômico de uma nação, à sua prosperidade e qualidade de vida de seu povo. Logo, a redução da poluição ambiental, expansão e substituição gradual de combustíveis fósseis por fontes de energia alternativas e renováveis são avanços essenciais no setor energético (CHEN; OSWALD, 1998; CONVERTI *et al.*, 2009).

Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de fontes diversificadas e baratas, como biomassa florestal, aquática, rejeitos de animais e até mesmo de resíduos sólidos urbanos (LI *et al.*, 2008). Evert; Eichoorn (2013) explicam que assim como a biomassa vegetal de plantas, algas e bactérias extintas foram responsáveis pelas fontes de óleo, carvão e gás que nossa sociedade tanto depende atualmente, as plantas modernas, juntamente com algas e bactérias são a esperança para a produção de energias renováveis e de um futuro mais sustentável.

Para Elrayies (2018) um dos organismos mais antigos da Terra, as algas apresentam características essenciais para contribuir e solucionar diversos problemas ambientais e energéticos. Luz, sais minerais e CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) são o que precisam para crescer, e crescem como uma biomassa capaz de ser transformada em diversos bioprodutos e biocombustíveis (Biodiesel, Bio-hidrogênio, bioetanol e o biogás).

### 3.1 A BIOMASSA MICROALGÁCEA COMO FONTE DE ENERGIA RENOVÁVEL

#### 3.1.1 Sobre as Microalgas

Alga é qualquer organismo que possua clorofila-*a*, talo não diferenciado em raízes, caule e folhas (LEE, 2008). Microalgas são algas microscópicas, de 5-50µm (UMMALYMA *et al.*, 2017), incluindo cianobactérias oxígeno-fotossintetizantes (TOMASELLI, 2004). Além disso, são um dos grupos de organismos mais antigos do planeta e representam a base da cadeia alimentar (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011).

As microalgas foram os primeiros organismos capazes de realizar a fotossíntese e atuarem na conformação da atmosfera da Terra. Por isso, as microalgas são elementos importantes no equilíbrio dos ecossistemas e da dinâmica do CO<sub>2</sub> (TOMASELLI, 2004). Pesquisadores dizem existir mais de 50 mil espécies de microalgas, mas somente cerca de 30 mil já foram identificadas (MATA, MARTINS; CAETANO, 2010).

Embora microscópicas, as microalgas possuem densidade ligeiramente maior do que a da água e apresentam mecanismos que auxiliam na sua flutuação. Geralmente armazenam amido como substância de reserva obtido através da fotossíntese. Estes microrganismos possuem uma variabilidade enorme, sendo que algumas espécies podem ser dotadas ou não de flagelos ou outras adaptações locomotoras (EVERT; EICHOORN, 2007).

As microalgas podem ser unicelulares, filamentosas ou coloniais, dotadas ou não de motilidade (EVERT; EICHOORN, 2007), com estrutura celular procariótica ou eucariótica (LI *et al.*, 2008). Elas possuem alta taxa reprodutiva (TOMASELLI, 2004), mas seu crescimento está diretamente ligado à disponibilidade e absorção de luz e nutrientes (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011a), como o CO<sub>2</sub>, fósforo e nitrogênio (TAN *et al.*, 2018). Dentro de suas células estes nutrientes são convertidos em macromoléculas: carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (YANG *et al.*, 2011).

Lee (2008) explica que a fotossíntese é um processo de conversão da energia luminosa em energia química, em que compostos inorgânicos, como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O são transformados em compostos orgânicos, como os carboidratos. Por ser composta em sua maioria de carboidratos, especialmente a celulose, a parede celular das microalgas atua como uma proteção à célula contra o ataque de outros organismos (TOMASELLI, 2004).

Evert; Eichoorn (2013) explica que as ondas luminosas utilizadas na fotossíntese consistem de apenas um pequeno espectro dentro dos diferentes comprimentos de onda que atingem o planeta. Os raios gama são os mais curtos, enquanto que as ondas de rádio são as que possuem os maiores comprimentos de onda. Para a fotossíntese, os comprimentos de onda ideais variam de 400 nm, correspondente à cor violeta, até 700nm, o vermelho. Esta é a faixa considerada fotossinteticamente ativa.

A estrutura simples das microalgas faz com que sejam organismos que possuem alta taxa fotossintética, assim, são capazes de produzir maior volume de biomassa do que organismos fotossintéticos terrestres, como as plantas (LI *et al.*, 2008). Os mesmos autores ainda expõem que as microalgas podem ser cultivadas em pequenas porções de terra e utilizando menor quantidade de água que plantas terrestres, viabilizando sua cadeia produtiva e uso final.

Os principais gêneros na indústria alimentícia humana e animal, extração de pigmentos e para biocombustíveis são: *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium*. Muitas espécies já são naturalmente encontradas em águas residuárias (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, 2014).

*Chlorella* sp. (FIGURA 3.1.1a) é um gênero de microalga de água doce; apresenta organismos unicelulares, cocóides, flagelados, filamentosos e multicelulares; possuem clorofila *a* ou *b* e seu cloroplasto tem duas membranas em forma de taça (TOMASELLI, 2004; LEE, 2008, p. 213). Por ser um dos gêneros mais importante na indústria de microalgas, é cultivada para diversos fins e é uma fonte atrativa de biomassa (BMA). Sua produção envolve o cultivo, recuperação da BMA e extração dos produtos desejados de acordo com a finalidade (TORK *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2018).

A BMA é uma fonte rica em proteínas compostas por uma vasta gama de aminoácidos. Elas também são abundantes em carboidratos, como a celulose, glicose, amido, entre outros sacarídeos e lipídeos, que podem chegar a constituir a maior fração de sua composição orgânica. Todos estes compostos são importantes na indústria alimentícia, farmacêutica e também na indústria energética (RAS *et al.*, 2011).

Dentre as diversas aplicabilidades da BMA, estão presentes na produção vitaminas, proteínas, pigmentos, óleos (como o Ômega-3), para fins nutricionais e ração animal (CHEN *et al.*, 2018). Além disso, se adaptam bem ao cultivo em águas residuárias, melhorando a qualidade

do tratamento de esgoto, de outros resíduos orgânicos, na bioconversão da energia solar (TAN *et al.*, 2018) e produção de biomassa para geração de biocombustíveis (UMMALYMA *et al.*, 2017).

Por estas e outras características, a BMA possui vantagens sobre outros tipos de matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Especialmente na produção de biometano através da digestão anaeróbia (DA), a BMA é um ótimo substrato, pois as algas são compostas de nutrientes essenciais para as bactérias anaeróbias (GONZÁLEZ- GONZÁLEZ *et al.*, 2018).



**FIGURA 3.1.1a.** *Chlorella vulgaris*. Foto cedida por Aline Dassoler.

### 3.1.2 O Cultivo de Microalgas para Produção de Biocombustíveis

O cultivo de microalgas para produzir biocombustíveis apresenta diversas vantagens em relação ao cultivo de plantas terrestres: podem ocupar terrenos não aráveis, baixa necessidade de água, podem ser cultivadas em água doce, salgada e até mesmo em água residuárias do tratamento de efluentes (PASSOS *et al.*, 2014). Desta forma, auxilia no tratamento e reuso da água para fins não potáveis, no aproveitamento de nutrientes existentes na água residuária (LI *et al.*, 2008).

A associação entre o cultivo de microalgas e o tratamento de esgotos oferece benefícios como a redução da carga poluidora dos efluentes e a reciclagem de nutrientes. Esta é uma associação simbiótica, em que bactérias heterotróficas presentes nos efluentes oxidam a matéria orgânica, produzem o carbono necessário para as microalgas – que o consome na forma de CO<sub>2</sub> – liberando O<sub>2</sub> (RIAÑO *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013).

A produção de microalgas em efluentes aumenta a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis (GUPTA *et al.*, 2018) e a pegada ecológica do processo (PASSOS *et al.*, *op. cit.*). Além do mais, as microalgas removem nutrientes do efluente (como o nitrogênio, amônia, fósforo e DQO – Demanda Química de Oxigênio), nutrientes que podem causar poluição e desastres naturais se jogados diretamente nos corpos hídricos (TAN *et al.*, 2018).

Contudo, águas residuárias naturalmente possuem algas, assim como patógenos, toxinas, predadores e competidores que podem afetar o crescimento das microalgas desejadas para produção de biocombustíveis. Por isso, é importante selecionar espécies de microalgas que são capazes de crescer nestas águas e remover seus nutrientes e contaminantes (JEBALI *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2018).

Do mesmo modo, o controle de parâmetros físico-químicos como a luminosidade, pH, temperatura, CO<sub>2</sub> e nutrientes podem afetar o desenvolvimento das microalgas (CHEAH *et al.*, 2016; MOLINUEVO-SALCES *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2018). Estes fatores alteram a taxa fotossintética das microalgas, podendo aumentar ou inibir seu desenvolvimento e a fixação de CO<sub>2</sub> (SRINUANPAN *et al.*, 2018). Normalmente, são indexadas faixas de tolerância para cada parâmetro, o pH varia entre 6 e 8, a temperatura de 20 a 30 °C (TAN *et al.*, 2018).

A luz é o principal fator para o crescimento das microalgas. Com a diminuição de nutrientes no meio de cultivo, a fotossíntese alcança a taxa máxima de crescimento até atingir o ponto de saturação. Após esta fase acontece a fotoinibição, que pode levar as células de microalgas a reduzir sua atividade e até a morte (TOMASELLI, 2004).

Outro fator que tem forte influência no cultivo de microalgas é a temperatura, que é diretamente proporcional ao crescimento das microalgas, variando de espécie para espécie. Em geral, as microalgas atingem taxas máximas de crescimento em temperaturas entre 28 e 35 °C. Em meios de cultivo fechados a temperatura pode ser mais facilmente controlada do que em sistemas abertos de cultivo (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, 2014).

Tanto a luminosidade quanto a temperatura e composição do meio de cultivo podem alterar o pH e afetar o crescimento das microalgas. A faixa ideal de pH é variável de acordo com a espécie, porém, considera-se o pH 8 como ideal para microalgas de água doce (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, *op. cit.*). Sialve *et al.* (2009) afirmam que a injeção de CO<sub>2</sub> pode ser uma maneira simples de controlar o pH e garantir uma fonte de carbono para as microalgas.

Nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo são essenciais para o crescimento das microalgas e são naturalmente encontrados em águas residuárias. Além destes, efluente de tratamento anaeróbio de esgoto também podem conter patógenos e competidores, como pertencentes aos grupos *Rotifera*, *Nematoda* e *Daphnia*. Estes organismos heterotróficos que compõem o zooplâncton podem atuar como predadores, reduzindo a população de microalgas (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, 2014).

O teor de oxigênio dissolvido é também um fator determinante no cultivo desses pequenos microrganismos fotossintetizantes. A saturação de oxigênio dissolvido no meio em que as microalgas crescem pode provocar inibição do crescimento das microalgas. Hernández-Pérez & Labbé (*op. cit.*) descrevem que, além de controlar a população de microalgas, o oxigênio dissolvido também controla a população de zooplâncton, sendo que, quanto menor a fração de oxigênio dissolvido, menor a chance de proliferação de espécies competidoras heterotróficas.

Li *et al.* (2011) concluíram que as microalgas conseguem utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de carbono, não somente o dióxido de carbono. Através deste estudo de remoção de DQO e DBO, observaram que microalgas são eficientes também na remoção de sólidos suspensos, nutrientes, coliformes e outros agentes patogênicos e tóxicos. Assim, as microalgas se mostram uma boa alternativa como tratamento de águas residuárias.

Brenner e Owende (2009) descrevem sobre as diversas vantagens do cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis, como:

- A produção acontece durante todo o ano, independente da estação;
- Utilização de energia solar para produzir matéria orgânica;
- O teor lipídico alcançado por algumas microalgas excede o que muitas sementes de oleaginosas é capaz de produzir;
- Alteração rápida e eficiente da composição orgânica a partir de simples modificações no meio de cultivo ou condições ambientais;

- O cultivo em águas residuárias reduz a sobrecarga do uso de mananciais de água doce e ainda reduz a carga poluidora desses resíduos, de onde elas retiram seus nutrientes;
- Biofixação de CO<sub>2</sub>, melhorando a qualidade do ar e;
- Alta taxa de crescimento, existem espécies que podem apresentar novas gerações a cada 3 (três) horas.

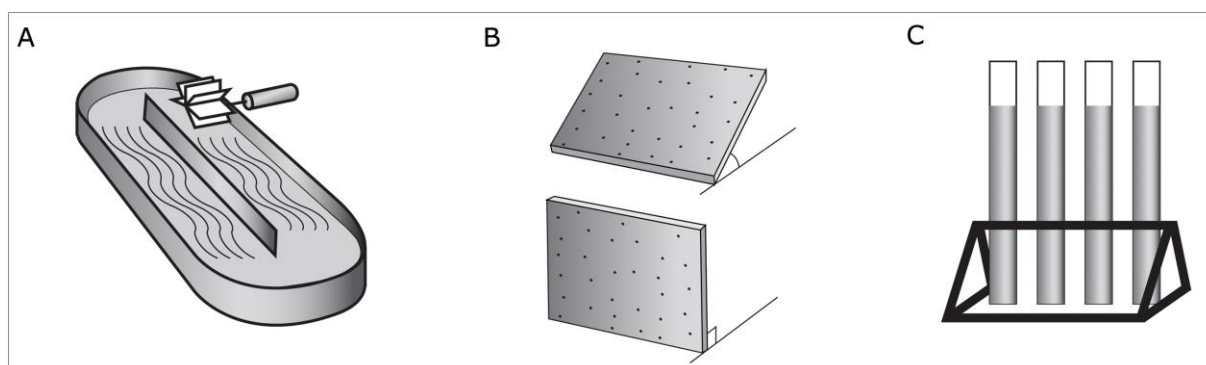
Há vários sistemas para cultivar microalgas, os mais comuns utilizam soluções simples e que exigem pouca manutenção, como as lagoas abertas (FIGURA 3.1.2a: A), expostas a condições ambientais de iluminação e temperatura e os fotobiorreatores (FBR), que aumentam a produção de BMA através do controle das condições de cultivo, como o pH, temperatura, luminosidade e quantidade de nutrientes disponíveis (DENER *et al.*, 2006; TAN *et al.*, 2018).

Para Hernández-Pérez & Labbé (2014), sistemas abertos já alcançaram seu desenvolvimento máximo. Estes sistemas geram baixa quantidade de biomassa, estão muito suscetíveis a contaminação, evaporação, baixa acessibilidade à luz por parte das microalgas e há necessidade de grandes extensões de terra. Porém, a construção e operação são mais simples e baratas do que sistemas fechados, além de serem mais duráveis.

Cultivar microalgas em FBR fechados é cada vez mais comum e financeiramente viável. Os FBR permitem o cultivo de microalgas com maior rendimento de biomassa e maior controle dos parâmetros físico-químicos, reduzindo o consumo de água, energia e produtos químicos (CHEN *et al.*, 2018). Eles podem ser projetados para melhorar a distribuição de luz, aumentando a eficiência fotossintética, difundindo melhor a luminosidade ao longo de toda a coluna d'água (SCHENK *et al.*, 2008).

Existem várias configurações de FBR (FIGURA 3.1.2a: B e C), variando de acordo com o objetivo de sua utilização (BEHRENS, 2005; BAHADAR; KHAN, 2013). Eles variam desde formas tubulares, espirais, placas planas ou colunares, construídos de plástico, acrílico, policarbonato ou vidro (DENER *et al.*, 2006; MILANO *et al.*, 2016, p.186). Podem ser arranjados horizontalmente, verticais, inclinados e até formando hélices para maximizar a produção de biomassa e superar os problemas associados ao cultivo em lagoas abertas (MILANO *et al.*, 2016).

Milano *et al.* (2016) explicam que além do controle das variáveis físico-químicas, os fotobiorreatores permitem a seleção de uma única espécie de microalga para o cultivo, aumentam a produtividade da BMA, reduzindo o tempo de retenção no FBR e o risco de contaminação. O controle adequado de parâmetros como pH, temperatura, luminosidade, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> permite produzir BMA de alta qualidade, compensando o alto custo que ainda é atribuído aos FBR (SCHENK *et al.*, 2008).



**FIGURA 3.1.2a.** Esquemas de fotobiorreatores. A escolha do tipo de fotobiorreator deve levar em consideração suas vantagens e desvantagens, o tipo de cultivo, local, clima, microrganismos etc. (A) Lagoa aberta de alta taxa (HRAP), (B) Fotobiorreator fechado plano, pode ser alinhado em 90° ou angulado, (C) Fotobiorreator tubular, também pode ser disposto na vertical ou de forma angular. **FONTE:** Adaptado de HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ (2014).

Portanto, os FBR são projetados para alcançar o máximo de eficiência, a geometria prioriza a área de iluminação e o diâmetro não deve ultrapassar 0,2m para permitir a difusão da energia luminosa através de toda a coluna do FBR (BAHADAR; KHAN, 2013). A zona fótica nos FBRs é essencial para o bom crescimento das microalgas, especialmente devido à matéria em suspensão, que inclui as próprias algas. Estes fatores garantem uma boa relação custo-benefício com máxima produção de BMA, baixo consumo de água e benefícios ambientais (CHEAH *et al.*, 2016).

O tamanho e diâmetro dos FBRs são fundamentais para seu bom desempenho, assim como a movimentação do cultivo dentro dele para evitar a sedimentação e acúmulo de biofilme nas paredes dos FBRs. Geralmente, os fotobiorreatores são indicados para plantas em pequena escala, sendo que o uso para fitorremediação, que exigem grandes volumes, não são ideais para o cultivo em FBR. Para experimentos laboratoriais, pequenos FBRs são ideais (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, 2014).

### 3.2 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGÁCEA

A separação (concentração ou recuperação) da BMA é um dos maiores desafios na produção de biocombustíveis a partir de microalgas, especialmente pelo seu tamanho reduzido e difusão no meio de cultivo (CHOY *et al.*, 2018). Por isso, este é um processo que pode aumentar o custo total de produção dos biocombustíveis de 20% a 50% (MOLINA-GRIMA *et al.*, 2003) e acarretar no uso de técnicas economicamente inviáveis, ambientalmente prejudiciais e energeticamente ineficientes.

Ummalyma *et al.* (2017) e Sigh; Patidar (2018) atribuem a dificuldade na recuperação da BMA ao pequeno tamanho das células das microalgas, à sua superfície negativamente carregada (-7,5 ~ -40 mV), baixa concentração e densidade similar à da água. Molina-Grima *et al.* (*op. cit.*) destacam que dentre os vários métodos para recuperação da BMA, é crucial que ele seja barato, não-tóxico e tenha boa eficácia.

A biomassa microalgácea pode ser obtida através de diversos métodos, como por sedimentação ou deposição por gravidade, centrifugação, filtração, precipitação, trocas iônicas, filtração por membranas e a floculação, que pode ser realizada usando coagulantes (CHEN *et al.*, 2011). A obtenção de BMA pela sedimentação natural consiste em deixar que o próprio peso das algas e os organismos mortos afundem naturalmente ao longo do tempo (o que depende de acordo com cada espécie), tornando este um processo lento e pouco viável economicamente (RAS *et al.*, 2011).

Contudo, características como a densidade e peso das células das microalgas influenciam diretamente na velocidade da sedimentação e na eficácia de deposição das células suspensas (CHEN *et al.*, 2011). Geralmente, a decantação ou sedimentação natural exige grandes lagoas para deposição das microalgas, que aliadas à lentidão do processo, torna o processo oneroso (SCHENK *et al.*, 2008). Golueke; Oswald (1965) fizeram testes de recuperação de microalgas e concluíram que a centrifugação e coagulação química são os métodos mais eficientes. Gupta *et al.* (2018) chegaram à mesma conclusão.

Molina-Grima *et al.* (*op. cit.*) propuseram a técnica de recuperação baseada na coagulação-floculação-sedimentação (CFS), contudo, ainda não existe um consenso quanto ao melhor tipo de coagulante nem sobre as dosagens ideais. A CFS consiste na agregação de partículas dispersas para formar partículas maiores que aumentam de tamanho e peso facilitando a

sedimentação (CHEN *et al.*, 2011). Nas microalgas, coagulantes neutralizam sua carga negativa fazendo com que as células se agrupem e formem flocos que sedimentam em um curto período de tempo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015a).

Hameed *et al.* (2018) explicam que a coagulação e floculação são etapas distintas. A coagulação é a neutralização de partículas coloidais de cargas negativas, enquanto que a floculação é a aglomeração dos coloides neutralizados formando flocos maiores que sedimentam por gravidade.

A floculação é um processo de separação com base química que requer menos energia do que outras técnicas, como a centrifugação e filtração. Resultado da colisão entre partículas e da interação de cargas entre o agente floculante e as microalgas, a floculação promove a acelerada aglomeração das partículas celulares aumentando a taxa e velocidade da sedimentação, otimizando o tempo operacional e reduzindo custos com menor gasto energético (GERDE *et al.*, 2014).

LETÉLIER-GORDO *et al.* (2014) enfatizam que a CFS é um dos métodos mais promissores para a separação das microalgas do meio de cultivo. Para eles, este método permite recuperar grande quantidade de biomassa e mantendo as células intactas, sem lise celular. Quando o coagulante é adicionado, a carga superficial negativa das microalgas é reduzida, que acarreta na formação de agregados maiores, os flocos, que rapidamente sedimentam. Os autores ainda destacam os inconvenientes que podem ocorrer durante o processo, como a alteração do pH e o acúmulo residual de subprodutos.

Para Gerde *et al.* (2014), a cinética da floculação depende também da frequência da colisão de partículas, assim como da velocidade da agitação e da concentração dessas partículas no meio de cultivo. Estes fatores podem influenciar no tempo e na forma dos aglomerados (flocos) que irão se formar. Portanto, há recomendações ótimas determinadas para que a floculação aconteça de modo eficiente, com pouco gasto energético e baixos danos ambientais.

Com vistas a ampliar a eficiência do método de coagulação, Letelier-Gordo *et al.* (2014) relatam que em culturas mistas de microalgas, pode-se utilizar, em vez de um agente coagulante, uma solução contendo diversos tipos de coagulantes, sempre testando cuidadosamente o pH. No estudo em questão, os autores obtiveram eficiência de remoção de biomassa na taxa de 95% com o cultivo mostrando pH 7. Já os cultivos que apresentaram pH 10, a média da taxa de eficiência de remoção foi de 96% ( $p > 0,05$ ).

Santos *et al.* (2018) afirmam que a CFS é uma técnica já empregada há décadas em estações de tratamento de água potável e águas residuárias domésticas e industriais. Nestes locais, o método é empregado para que se remova a turbidez das águas residuárias, principalmente devido às partículas sólidas suspensas e dissolvidas, que adicionam cor à água. A CFS é um procedimento considerado eficaz e bastante simples.

### 3.2.1 Tipos de Coagulantes

Os compostos utilizados na recuperação de biomassas, tratamento de água potável e residuária podem ser divididos em dois grandes grupos: os coagulantes inorgânicos minerais e sais metálicos, como o cloreto de polialumínio (PAC), o sulfato de alumínio, cloreto férrico e sulfato ferroso. Sua principal vantagem é o baixo custo quando comparado a outros tipos de coagulantes. O outro grupo é composto por coagulantes orgânicos, estes podem ser derivados de bactérias, fungos e fontes vegetais (SANTOS *et al.*, 2018).

A CFS é bastante difundida e pode ser empregada utilizando coagulantes inorgânicos ou orgânicos. Apesar de coagulantes inorgânicos serem muito eficazes e serem referência no tratamento de água, na recuperação de BMA e lodos de esgoto, possuem risco de contaminação ambiental e da biomassa (FRANCISCO, 2016; GUPTA *et al.*, 2018). Não obstante, exigem altas doses de aplicação, são sensíveis a variações no pH e para cada espécie de microalgas é exigido um coagulante com características químicas diferentes (CHEN *et al.*, 2011.).

Sabe-se também que os coagulantes inorgânicos convencionais, como os que contem  $Al_3^+$  e  $Fe_3^+$  adicionam esse ônus ao meio ambiente, uma vez que produz lodos com baixa biodegradabilidade, podem oferecer risco à saúde pública e ainda inviabilizar o uso do lodo ou da biomassa, já que o coagulante é recuperado junto da biomassa, resultando em um produto contendo doses de sais inorgânicos que podem prejudicar o uso do produto obtido (HAMEED *et al.*, 2016).

Por outro lado, diversos dos impactos negativos provocados pelos coagulantes inorgânicos são superados pelos coagulantes orgânicos (VANDAMME *et al.*, 2010). Bilanovic *et al.*, (1988) *apud* Chen *et al.*, 2011, afirmam que os coagulantes orgânicos são bastante indicados para a

recuperação de BMA. O uso destes polímeros naturais é uma alternativa mais eficiente e sustentável, já que além de exigirem uma dosagem menor de aplicação em relação aos inorgânicos, não contaminam a BMA nem o ambiente (GUPTA *et al.*, 2018).

Há muitos esforços para desenvolver coagulantes que sejam mais eficientes na floculação, ambientalmente amigáveis e que não gere resíduos tóxicos. Como já dito, a gama de coagulantes orgânicos é extensa, existindo coagulantes que são produzidos por microrganismos, como as bactérias e fungos. Ainda há os coagulantes derivados de vegetais, derivados de plantas superiores como os gêneros *Acacia* sp., *Castanea* sp. e *Schinopsis* sp. (HAMEED *et al.*, 2016).

Taninos são bastante populares na coagulação de microalgas e geralmente extraído da espécie *Acacia mearnsii*. Para adicionar propriedades catiônicas a este composto, adiciona-se formaldeído, nitrogênio quaternário (NH<sub>4</sub>Cl) e ácido clorídrico, e, por fim, é aquecido para evaporação da fase líquida e a transformação em um pó, que é solubilizado para formação do coagulante (BELTRÁN-HEREDIA & SÁNCHEZ-MARTÍN, 2009).

Segundo Sanchez-Martin *et al.* (2010), o uso de coagulantes orgânicos derivados de tanino apresenta maior remoção de turbidez do que o sulfato de alumínio. Este fato é devido à capacidade que os taninos possuem de formar redes que agem desestabilizando as partículas coloidais e reagrupando-as em agregados maiores que se unem e ficam estabilizados pela neutralização das cargas negativas dos coloides.

Os agentes de coagulação orgânicos derivados de amido de batata, mandioca, trigo e milho são biodegradáveis e não geram acúmulo de sais inorgânicos na biomassa obtida. Além disso, eles são mais baratos do que sais inorgânicos, não alteram o pH e exigem doses menores de aplicação, contudo, são específicos para determinadas espécies de microalgas (VANDAMME *et al.*, 2010; GERDE *et al.*, 2014; LETELIER-GORDO *et al.*, 2014).

Dentre os vários tipos de coagulantes orgânicos, Vandamme *et al.* (2010) explicam que os amidos catiônicos possuem grupos amino quaternários em sua composição, o que os faz altamente resistentes a variações de pH, atuando na faixa de pH de 4 a 10. Desta forma, a partir das observações de Vandamme *et al.* (*op. cit.*) e dos resultados de Letelier-Gordo *et al.* (*op. cit.*), os autores concluíram que a variação de pH mostrou não interferir no processo de CFS baseado em amido catiônico, uma vez que a eficiência de remoção entre os pH 7 e 10 foi de somente 1%.

Cassini *et al.* (2017) pesquisaram a eficiência do coagulante inorgânico Sulfato de alumínio e os orgânicos: pó de semente de moringa, goma de quiabo, tanino modificado e amido catiônico de mandioca. Os pesquisadores concluíram que o tanino modificado e o amido catiônico de mandioca tiveram melhor eficiência de coagulação, especialmente devido à sua biodegradabilidade (UMMALYMA *et al.*, 2017). Além disso, a BMA foi mantida com pH entre 8 e 11, faixas ideais para a digestão anaeróbia (ZAMALLOA *et al.*, 2011).

Gutiérrez *et al.* (2015a) estudaram o efeito dos coagulantes *Ecotan* (Espanha) e *Tanfloc* (tanino modificado proveniente do Brasil) e concluíram que estes coagulantes utilizados para recuperação da biomassa de microalgas não têm efeito algum sobre a DA. Gutiérrez *et al.* (2015b) utilizaram amido de batata como coagulante e verificaram que além de o coagulante não ter efeitos inibitórios na DA, a BMA coagulada com amido de batata produziu mais biometano do que a biomassa controle sedimentada naturalmente.

Por fim, a escolha do método de recuperação da biomassa pode afetar o seu uso final, podendo haver contaminação e/ou formação de subprodutos tóxicos (conhecidos ou não), podendo estes prejudicar a digestão anaeróbia ou outro tipo de processamento e reduzir o teor de nutrientes da biomassa. Estas reações indesejadas decorrem geralmente do uso de agente coagulantes inorgânicos. Ao contrário, a aplicação de coagulantes orgânicos é menos tóxica, mais segura, biodegradável, favorável ao meio ambiente, à BMA e a digestão anaeróbia (CHOY *et al.*, 2018) (TABELA 3.2a).

**TABELA 3.2a.** Vantagens e desvantagens dos métodos utilizados neste estudo para recuperação de biomassa microalgácea.

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Sedimentação Natural</b>	Baixo ou nenhum custo energético, Não contaminação da biomassa e do meio ambiente.	Processo lento, Baixa eficiência de remoção.
<b>Coagulação-Floculação inorgânica</b>	Alta eficiência de remoção de biomassa, Tempo curto de operação, Baixo gasto energético, Simplicidade operacional.	Alto preço dos coagulantes, Contaminação da biomassa, Controle do pH do cultivo, Especificidade, Danos ambientais.
<b>Coagulação-Floculação orgânica</b>	Alta eficiência de remoção, Tempo curto de operação, Baixo gasto energético, Biomassa biodegradável, Ambientalmente amigável.	Alto custo quando aplicadas altas dosagens do coagulante.

FONTES: Molina-Grima *et al.* (2003); Vandamme *et al.* (2010); Gerde *et al.* (2014).

### 3.3 PRÉ-TRATAMENTOS NA BIOMASSA MICROALGÁCEA

As microalgas são conhecidas por serem bastante resistentes ao ataque de microrganismos (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957) e essa rigidez da parede celular é a principal barreira encontrada para a eficiência da digestão anaeróbia (DEBOWSKI *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2017). Este fato faz com que a DA das microalgas seja mais lenta do que outros tipos de biomassa (MAHDY *et al.*, 2014). Com o objetivo de liberar o conteúdo intracelular das microalgas para os microrganismos, os pré-tratamentos (ou hidrólise) aumentam a eficiência da DA e da produção de biometano (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011b; MENDEZ *et al.*, 2013).

Dentre as características favoráveis da aplicação de um pré-tratamento na biomassa microalgácea pode-se citar o aumento da biodisponibilidade de matéria orgânica, liberação de organelas para o meio extracelular, degradação de sólidos orgânicos, incremento na produção de biometano, redução da massa não digerível e redução de outros custos operacionais em processos posteriores, como a digestão anaeróbia (ZHEN *et al.*, 2017).

Acelerar o processo de decomposição através de pré-tratamentos na biomassa não significa melhorar seu rendimento (BHARATHIRAJA *et al.*, 2018). Contudo, para Raheem *et al.* (2018), os pré-tratamentos podem melhorar não só a digestibilidade de compostos orgânicos, assim como a eficiência da atividade das arqueias metanogênicas no processo de digestão anaeróbia.

Córdova *et al.* (2018) esclarece que os pré-tratamentos podem também reduzir o tamanho e a cristalinidade das partículas que compõem a biomassa, solubilizar compostos recalcitrantes e pode desativar agentes tóxicos. Ademais, os autores ressaltam que os pré-tratamentos devem preservar a estrutura dos compostos orgânicos e evitar a formação de compostos inibitórios.

Cho *et al.* (2013) afirmam que a aplicação da biomassa microalgácea na digestão anaeróbia é dificultada pelo longo tempo de retenção dentro dos biodigestores, podendo chegar a 50 dias. A baixa biodegradabilidade (inferior a 50%) deste substrato é causada pela retardação da etapa de hidrólise, já que a parede celular das microalgas é uma barreira forte que não permite a entrada de enzimas hidrolíticas facilmente.

A biodegradabilidade de um substrato orgânico pode variar de acordo com a sua composição (ABBASSI; ALI; WATSON, 2014). Naturalmente, algumas espécies de microalgas possuem alto grau de decomposição da parede celular, enquanto outras possuem baixa degradabilidade,

principalmente devido à presença de compostos recalcitrantes. Por exemplo, as algas marinhas possuem parede celular mais fácil de ser destruída do que algas de água doce (MUSSGNUM *et al.*, 2010).

Por isso, cada tipo de pré-tratamento é mais indicado para um tipo de biomassa (PASSOS *et al.*, 2013). Para a geração de biometano através da DA, os mais eficientes são os pré-tratamentos com ultrassom, hidrólise térmica e alcalina (CHO *et al.*, 2013). Contudo, existem outros tipos de pré-tratamentos, como a hidrólise enzimática, ultrassom, micro-ondas, ozonização, autoclavagem, entre outras (TABELA 3.3a) (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011c; ALZATE *et al.*, 2012).

**TABELA 3.3a.** Tipos de pré-tratamentos ou hidrólise.

<b>PRÉ-TRATAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
<b>Ultrassom</b>	Energia de entrada Tempo de exposição	Aumento da produção de metano, eficaz na degradação de resíduos celulares, baixo custo operacional, fácil manutenção	Demanda de alta energia, inadequada para lignocelulose, sondas requerem substituição a cada 1,5 a 2 anos
<b>Micro-ondas</b>	Energia de entrada Tempo de exposição Frequência	Aquecimento rápido e uniforme, aumento do rendimento de metano, remoção de patógenos, facilidade de controle	Demanda de alta energia, escalabilidade, limitada a substratos baseados em células microbianas
<b>Térmico</b>	Temperatura Tempo de exposição Pressão	Aumento da produção de metano, saneamento, remoção de odores, redução de lodo, melhor desidratação	Alta demanda de energia e custo de capital, risco de formação de compostos recalcitrantes, liberação de amônia
<b>Ácido</b>	Dosagem Tempo de exposição	Aumento da produção de metano, dispositivo simples, fácil operação, baixo custo, efetivo para biomassa lignocelulósica	Custo químico, corrosão, materiais especiais para a construção de reatores, neutralização depois da digestão
<b>Alcalino</b>	Dosagem Tempo de exposição	Maior rendimento de metano, dispositivo simples, operação fácil, baixo custo, adequado para quebra de lignina	Custo químico, corrosão, materiais especiais para construção de reatores, toxicidade de Na <sup>+</sup> , risco de formação de compostos recalcitrantes, neutralização depois da digestão
<b>Ozonização</b>	Dosagem Tempo de exposição	Aumento da produção de metano, remoção de patógenos, redução de lodo, operação flexível	Alta demanda de energia, risco de mineralização liberada de materiais celulares

Continua...

Continuação...

<b>Enzimática</b>	Quantidade Tempo de Exposição	Realizada em baixas temperaturas, baixa formação de subprodutos, remove quantidade considerável de lignina	Alto custo, maior tempo reacional, controle rigoroso das condições, inibição de enzimas por outras substâncias
-------------------	----------------------------------	--	--

**FONTE:** Modificado de Zhen *et al.* (2017).

Zhen *et al.* (2012) destaca que a hidrólise química faz uso de reagentes para deformar a parede e/ou membrana celular das microalgas ou outro substrato. Desta forma, é favorecido o ataque enzimático dos microrganismos anaeróbios à matéria orgânica disponibilizada. Basicamente, a hidrólise química é realizada através de agentes ácidos, básicos ou oxidantes, como os peróxidos. O princípio do pré-tratamento alcalino está nos processos de saponificação e solvatação que rompem ligações éster intermoleculares de compostos complexos de polissacarídeos induzindo a sua despolimerização, em especial a lignina, celulose e hemicelulose.

Dentre as diversas soluções alcalinas que são usadas, as mais frequentes são o NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub>, CaO e amônia. A acrescimento do agente alcalinizante despreza o uso de altas temperaturas, podendo ser realizada em temperatura ambiente (ZHEN *et al.*, *op. cit.*). O NaOH é considerado o mais efetivo na solubilização de matéria orgânica e no aumento da produção de biogás através da digestão anaeróbia.

O hidróxido de sódio (NaOH) é largamente utilizado na hidrólise devido ao seu alto poder alcalinizante que afrouxa a parede celular das microalgas, aumenta a porosidade das células, rompendo carboidratos e sem produzir inibidores (BENSAH; MENSAH, 2013). Para Yan *et al.* (2010), realizar o controle do pH da BMA através da hidrólise alcalina é eficiente e viável até mesmo em larga escala. Ao se comparar com outras metodologias de pré-tratamentos para a biomassa microalgácea, a hidrólise alcalina é bastante vantajosa nos quesitos simplicidade operacional, ferramentas simples para execução e alta eficiência (LI *et al.*, 2012).

Mesmo que He *et al.* (2017) afirmem que o impacto ambiental da hidrólise alcalina com NaOH seja baixo, González-González *et al.* (2018) descrevem que a maior desvantagem da hidrólise química é a potencial contaminação da biomassa. Estes últimos ainda afirmam que para melhor desempenho da hidrólise química, sua associação com a hidrólise térmica tem se mostrado bastante eficiente.

O substrato pré-tratado com hidrólise alcalina em que há sobrecarga de NaOH pode se tornar incompatível com a digestão anaeróbia. Íons dispersos de Na<sup>+</sup> são capazes de interferir nas vias metabólicas dos microrganismos anaeróbios e deteriorar a produção de biometano. Destaca-se a importância de se conhecer o substrato a ser hidrolisado e garantir afinidade para solubilização de compostos orgânicos (ZHEN *et al.*, 2017).

Pré-tratamentos à base de NaOH são muito eficazes no aumento da digestibilidade da matéria orgânica com pouca lignina, como as microalgas (BALI *et al.*, 2014; ZHEN *et al.*, 2017). Sun e Cheng (2002) realizaram a hidrólise com NaOH em madeiras lignocelulósicas e constataram que as ligações entre a lignina e outros carboidratos, como a celulose, eram quebradas após o pré-tratamento. Viram também que a digestibilidade de madeira dura aumentou de 14% para 55% (p. 5).

Mendez *et al.* (2013) realizaram a digestão anaeróbia de *Chlorella vulgaris* hidrolisadas com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, obtendo ótimos resultados para o rendimento de biometano destas biomassas. O pré-tratamento alcalino mostrou melhor produção de biometano (237,9 mL CH<sub>4</sub> g.DQO<sup>-1</sup>), enquanto a hidrólise ácida produziu 221,8 mL de CH<sub>4</sub> g.DQO<sup>-1</sup>. Os autores concluíram que ambas as hidrólises, ácida e alcalina, melhoraram o processo de digestão anaeróbia e a produção de biometano comparando com a biomassa pura.

É esperado que quanto mais álcali é adicionado à biomassa, maior seja o pH. Li *et al.* (2012) também afirmam que é comum que o pH decaia naturalmente ao passar do tempo, contudo, em seus experimentos perceberam que, especialmente com dosagens altas de NaOH (acima de 60 mg/L) a diminuição do pH foi bastante limitada. Concluíram que, sem a interrupção da hidrólise, a digestão anaeróbia seria afetada por residual de NaOH na biomassa.

Ainda nos ensaios de Li *et al.* (2012), o processo de produção de biometano decresceu de acordo com o aumento da dosagem de NaOH utilizada no pré-tratamento. Uma dose baixa de NaOH (0,005 mol/L) não foi suficiente para solubilização de matéria orgânica da biomassa, enquanto que doses mais altas (superiores a 40 mg/L NaOH) reduziu a atividade na digestão anaeróbia. E, mesmo que o inóculo tenha a capacidade de resistir a variações de pH entre 8 e 9, o processo de produção de biometano foi reduzido.

Zhang *et al.* (2015) realizaram hidrólise alcalina com NaOH durante 1 hora com pH 10. Eles observaram que as concentrações de carboidratos e proteínas aumentaram consideravelmente em relação à biomassa não hidrolisada. A hidrólise também causou o aumento de nitrogênio

amoniaco proporcionalmente com o aumento da dosagem de NaOH, sendo que na dosagem de 80 mg NaOH ocorreu a volatilização de nitrogênio amoniacal total.

LI *et al.* (2012) esclarecem que em muitos ensaios exige-se alta dosagem de NaOH para que a hidrólise seja capaz de liberar material intracelular para o meio. Contudo, para que não haja interferência do agente alcalinizante na biomassa é preciso neutralizar a biomassa pré-tratada com ácido para frear a hidrólise e retornar o pH à neutralidade, ideal para a digestão anaeróbia.

### 3.4 A DIGESTÃO ANAERÓBIA DA BIOMASSA MICROALGÁCEA PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

A degradação biológica de biomassa através de reações químicas e biológicas associadas a processos metabólicos de microrganismos é chamada de digestão anaeróbia (DA) (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, 2014). A DA acontece naturalmente no meio ambiente e para Cassini (2003), a digestão anaeróbia é um processo de estabilização biológica bastante complexo. Neste processo é realizada a transformação de compostos orgânicos complexos em outros mais simples, como os gases metano e gás carbônico. O autor ainda ressalta que a condição anóxica é fundamental para o desenvolvimento adequado do consórcio microbiano.

Sistemas de degradação anaeróbia de matéria orgânica tem se tornado uma alternativa tecnológica ao saneamento e tratamento de esgoto doméstico. Além de serem mais eficazes na redução da carga orgânica do esgoto, geram menos lodo, gastam menos energia do que sistemas aeróbios, produzem lodo anaeróbio que serve como fertilizante e ainda gera energia através da produção de biogás (CHERNICARO, 1997) (TABELA 3.4.a).

**TABELA 3.4a.** Vantagens da digestão anaeróbia no tratamento de esgotos.

<b>ENERGIA</b>	<b>MEIO AMBIENTE</b>	<b>ECONOMIA</b>
Produz energia através do biogás, Não utiliza eletricidade.	Baixa geração de lodo, Lodo produzido é rico em nutrientes e estabilizado, Redução da carga patogênica do lodo.	Baixo investimento para implantação e manutenção, Recuperação de nutrientes, Aplicável em qualquer escala e local.

**FONTE:** adaptado de Lambertti (2017).

O primeiro estudo sobre a DA de biomassa de microalgas na produção de biocombustíveis foi realizado por Golueke; Oswald e Gotaas (1957), enfatizando que o principal desafio da produção de biometano a partir da BMA é a sua lenta biodegradabilidade, que acarreta em um baixo rendimento de biometano (ALZATE *et al.*, 2012). Mesmo assim, a DA é uma alternativa viável se comparada a outros métodos de conversão da BMA em biocombustíveis (CÓRDOVA *et al.*, 2018).

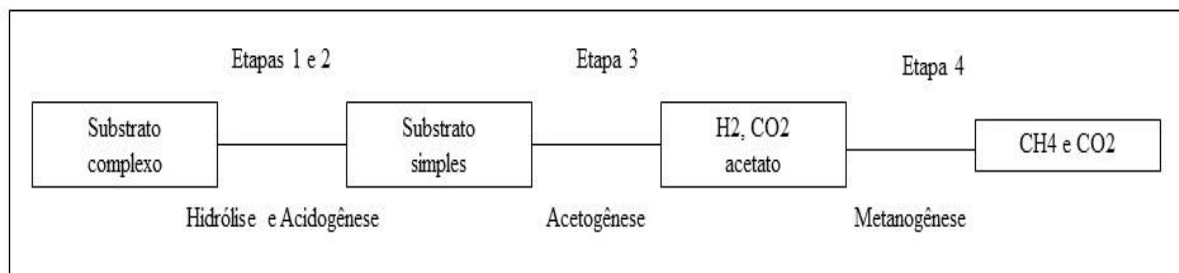
Alvo de estudos desde os anos de 1950, a DA teve seu apogeu na década de 1970 com a crise mundial do petróleo (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009). Atualmente, o crescente interesse na produção de energia através da DA é devido, principalmente, à alta capacidade de tratar e converter diferentes fontes e quantidades de resíduos orgânicos em energia renovável, limpa e sustentável (GONZÁLEZ- GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Milano *et al.* (2016) afirmam que todo tipo de matéria orgânica é adequada para a digestão anaeróbia. Schenk *et al.* (2008) complementam que, as microalgas são substratos ricos em compostos orgânicos, como carboidratos, lipídeos e proteínas, tornando-as ideais para a digestão anaeróbia e a produção de biometano.

Na DA (FIGURA 3.4a) um consórcio de microrganismos especializados decompõe compostos orgânicos num ambiente livre de oxigênio e com temperatura mesofílica entre 30 e 40 °C (KINNUNEN; CRAGGS; RINTALA; 2014; GONZÁLEZ- GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Na primeira e segunda etapa, bactérias hidrolíticas e acidogênicas hidrolisam a matéria orgânica complexa (carboidratos, proteínas e lipídeos) em moléculas menores e solúveis, os monômeros como açúcares, aminoácidos e ácidos graxos. Na terceira etapa bactérias acidificadoras convertem essas moléculas simples em ácidos orgânicos (ácido acético e etanol) (RAHEEM *et al.*, 2018).

A quarta e última etapa é realizada pelas arqueias metanogênicas, que quebram os ácidos orgânicos em biometano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), os principais componentes do Biogás (PASSOS *et al.*, 2014; PATINVOH *et al.*, 2017). Além do biogás, que é rico em biometano de alto poder calorífico (5.000 Kcal/m<sup>3</sup> - IGONI *et al.*, 2008), o lodo anaeróbio pode ser empregado como biofertilizante, substituindo os fertilizantes minerais (BHARATHIRAJA *et al.*, 2018).

Na etapa 4, dois tipos de consórcios microbianos realizam a produção de biometano. As arqueias metanogênicas acetoclásticas são responsáveis por cerca de 70% da produção de biometano de um consórcio, transformando o acetato em metano e dióxido de carbono. Arqueias metanogênicas hidrogenotróficas são capazes de gerar metano convertendo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> em CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O. Todos estes processos apresentam cinética lenta e baixa transferência de massa, sendo altamente dependentes da temperatura (GHAIBA & BEN-FARESB, 2018).



**FIGURA 3.4a.** Etapas da digestão anaeróbia. Fonte: modificado de Pilli *et al.* (2011).

A adição da biomassa microalgácea em reatores de digestão anaeróbia objetiva o aumento do potencial de metano e, conseqüentemente, aumentar a produção energética. A biomassa de microalgas pode ser 5 a 10 vezes mais produtiva na DA em relação à biomassa de plantas terrestres (CAI; PARK; LI, 2013; EVERT; EICHOORN, 2013; PASSOS *et al.*, 2014).

Apesar de haver liberação de CO<sub>2</sub> na queima do biogás, não se pode considerá-lo um contribuinte para o efeito estufa, pois esse CO<sub>2</sub> é resultante da absorção através da fotossíntese quando as algas estavam em crescimento (IGONI *et al.*, 2008). Pode-se dizer que este é um processo com carbono neutro (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011a; ZAMALLOA *et al.*, 2011).

São muitos os fatores que influenciam na DA. O pH e a temperatura do biodigestor são parâmetros importantes (CÓRDOVA *et al.*, 2018). Além destes, a composição de espécies microbianas e da microalga escolhida para compor a biomassa, pois algumas espécies podem apresentar problemas de baixa degradabilidade da BMA (RAMOS-SUÁREZ; CARRERAS, 2014). A baixa degradabilidade de algumas espécies está ligada à composição de sua parede celular, geralmente estruturas complexas compostas de celulose e hemicelulose, que limitam o acesso dos microrganismos ao conteúdo intracelular das microalgas (RAHEEM *et al.*, 2018).

Compostos nitrogenados e nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) são capazes de alterar a dinâmica do processo de digestão anaeróbia. A temperatura e o pH podem ser fatores que influenciam na disposição dos compostos nitrogenados na biomassa, favorecendo sua concentração e afetando o comportamento dos microrganismos sensíveis a estes compostos (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Sialve, Bernet e Bernard (*op. cit*) ainda afirmam que o excesso de nitrogênio amoniacal pode afetar o metabolismo das arqueias metanogênicas através da inibição da síntese enzimática do

metano, afetando diretamente a produção deste gás. Além disso, Chen *et al.* (2011) alegam que a alta concentração de compostos nitrogenados durante a digestão anaeróbia afeta também os microrganismos acidogênicos, afetando as etapas iniciais da digestão anaeróbia.

Outra influência no bom desenvolvimento da digestão anaeróbia e na produção de metano é o teor de sólidos totais (ST), tão importante quanto a relação substrato/inóculo em um biodigestor anaeróbio. Alzate *et al.* (2012) notaram que a redução no teor de ST ocasionou em perdas de até 15% na produção de biometano, enquanto que o aumento na concentração dos ST também aumentou a produção do gás na mesma proporção.

Cho *et al.* (2013) destacam que, especificamente sobre a produção de biometano, quando o substrato se encontra em baixas concentrações, a produção de ácidos graxos voláteis também é reduzida, o que interfere na atividade dos microrganismos produtores de metano e, conseqüentemente, na produção do biometano. Portanto, a concentração de sólidos totais pode ter influências positivas e negativas na digestão anaeróbia e produção de biometano.

### **3.4.1 Quantificação de Biometano**

Através da Atividade metanogênica específica (AME) mede-se a produção máxima de biometano em condições específicas, observando a capacidade de conversão de um substrato orgânico em biometano (AQUINO *et al.*, 2007). Os microrganismos envolvidos no processo de DA possuem relações complexas e interdependentes e a AME é um dos parâmetros mais importantes no monitoramento da DA. É calculada por unidade de biomassa (Sólidos Suspensos Voláteis) e unidade de tempo, em ambiente anaeróbio e através de equipamento capaz de monitorar a atividade metabólica microbiana (POETSCH; KOETZ, 1998).

Rocha (2003) afirma que os resultados do teste de AME podem mudar de acordo com a metodologia escolhida para sua execução. Assim, os resultados da AME devem ser usados com cautela, afinal, não existe uma padronização aceita internacionalmente para a AME. Logo, metodologias e condições experimentais diferentes podem levar a resultados de AME também diferentes, tornando-se difíceis de serem comparados entre si. Em virtude disso, os resultados obtidos representam as atividades específicas relativas e não necessariamente as absolutas.

Poetsch e Koetz (1998) afirmam que para garantir um bom resultado em testes AME, deve-se garantir um ambiente anaeróbio, condições ambientais adequadas e nutrientes suficientes para máxima atividade biológica. Também é muito importante ter uma população adequada e viável de microrganismos, alimento o bastante para se chegar à taxa máxima de remoção do substrato e um equipamento adequado capaz de realizar a medição da atividade metabólica dos microrganismos. A vantagem da AME é sua rapidez e precisão, medindo apenas o biometano produzido pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas.

O excesso de nutrientes e substrato são fatores que garantem um bom resultado de AME, uma vez que a atividade do inóculo vai garantir a duração do teste. A relação alimento/microrganismos (A/M) é muito importante, pois quanto maior a concentração do inóculo, essa relação decresce com o consumo mais rápido do substrato (AQUINO *et al.*, 2007). Uma vez que a DQO expressa toda a matéria orgânica do inóculo, determinar a porção de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), ou seja, da parte biodegradável do substrato, o alimento, é um ponto que influencia diretamente nos resultados da AME.

Jawed & Tare (1999) e Aquino *et al.* (2007) explicam que uma quantidade conhecida de inóculo deve ser usada para realização da AME. Normalmente este valor está entre 2 a 5 g/L de SSV, seguindo a proporção de 0,5gDQO/gSSV entre inóculo e substrato. Assim é possível estimar-se a capacidade que o inóculo possui para tratar a matéria orgânica e remover frações de DQO e/ou DBO.

Grande parte do biometano produzido na DA, cerca de 70% é derivado do acetato gerado pelo metabolismo dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, enquanto que os outros 30% do biometano restante deriva da atividade de microrganismos hidrogenotróficos (AQUINO *et al.*, 2007). Existe um consenso sobre a temperatura ideal para a realização da AME, que gira em torno dos 30 a 35 °C (CHERNICARO, 1997; KINNUNEN; CRAGGS; RINTALA, 2014). Sobre a transferência de experimentos laboratoriais de AME para a escala real, Aquino *et al.* (2007) afirmam que:

... deve-se avaliar criticamente o resultado do teste de AME, uma vez que os reatores anaeróbios em operação nas estações de tratamento ficam submetidos à variação sazonal de temperatura, e raramente trabalham na faixa de temperatura ideal para a atividade metanogênica. Sendo assim, o resultado de AME determinado em laboratório pode superestimar a capacidade de conversão dos microrganismos metanogênicos no reator exposto a condições ambientais diferentes (p. 195).

O teste AME é bem simples: um substrato orgânico (como a biomassa de microalgas) é adicionado a um inóculo anaeróbio (como os lodos anaeróbios resultantes do tratamento de esgotos) e as condições operacionais são definidas (como a temperatura, pH e o tamanho das partículas de lodo e das microalgas) (HUSSAIN; DUBEY, 2017). A temperatura é um parâmetro que influencia fortemente o andamento da AME, pois, mesmo que altas temperaturas resultem em uma alta taxa de produção de biometano, existem bactérias sensíveis a altas temperaturas que podem morrer e prejudicar as fases subsequentes da digestão anaeróbia (ESPOSITO *et al.*, 2012).

Em relação ao pH ideal para execução da AME, existe um consenso de pH dentro da faixa de neutralidade (de 7 a 7,8). Arqueias metanogênicas podem ser inibidas com pH inferior a 6, assim como a alcalinidade extrema também pode ser inibitória (POETSCH; KOETZ, 1998; HUSSAIN; DUBEY, 2017). Os métodos mais comuns de medir a atividade metanogênica são: método manométrico e método volumétrico. Não existe um método padrão universalmente aceito, além disso, os métodos possuem adaptações e variações de diversos parâmetros, o que dificulta a escolha do mais adequado para cada estudo e na comparação de resultados (HIMANSHU *et al.*, 2017).

O método volumétrico é iniciado com a inoculação do lodo anaeróbio e do substrato nos reatores sob condições controladas de temperatura, pressão e pH. O ensaio é finalizado quando acontece a estabilização da quantidade de biometano gerado. Em métodos manuais, o monitoramento da produtividade de biometano é feito com uma agulha esmerilhada ou cromatografia gasosa (AQUINO *et al.*, 2007). Já o método manométrico mede a produção de biogás através da variação da pressão sob um sensor que permite determinar tanto a produção líquida de biogás, como a taxa de biometano (POETSCH; KOETZ, 1998; AQUINO *et al.*, 2007).

Apesar de ser uma ferramenta útil na determinação da produtividade de biometano e biogás de certa comunidade microbiana, a AME deve ter seus procedimentos bastante detalhados para garantir que os resultados sejam expressos adequadamente. Afinal, existem diversas metodologias para a realização de testes de atividade metanogênica específica e cada método é apropriado para um tipo de trabalho (POETSCH; KOETZ, 1998). Logo, o teste de AME é fundamental para avaliar o desempenho de reatores anaeróbios, assim como efeitos inibitórios que podem ocorrer ao longo do processo de DA e a capacidade do lodo em degradar o substrato para gerar energia na forma de biogás.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CULTIVO DAS MICROALGAS

#### 4.1.1 Preparo dos Inóculos

Uma cultura mista de microalgas, dominada pelo gênero *Chlorella* sp., deu início ao preparo de inóculos. A cepa L06 isolada de efluente sanitário foi proveniente o Laboratório de Saneamento (LabSan), na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O efluente de UASB foi obtido na Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE) da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), no bairro de Araçás, Vila Velha, ES.

O cultivo de 5 (cinco) inóculos ocorreu em Erlenmeyers de 500 mL preenchidos com 25 mL da cultura-mãe L06 e 250 mL de efluente de UASB filtrado em bomba a vácuo com membrana de fibra de vidro Macherrey-Nagel 85/70BF 47mm. Os inóculos foram mantidos sob irradiação luminosa artificial fluorescente (Sylvania Fluor 20W LD PLUS T-10 5000K), 24 h/dia a 25°C e agitação manual, também diária.

Após 7 (sete) dias de cultivo, os inóculos foram alimentados com 100 mL do mesmo efluente citado anteriormente, até que, na semana seguinte (completando 14 dias de crescimento) foram transferidos para o crescimento em fotobiorreatores (FBR).

#### 4.1.2 Crescimento em Fotobiorreatores

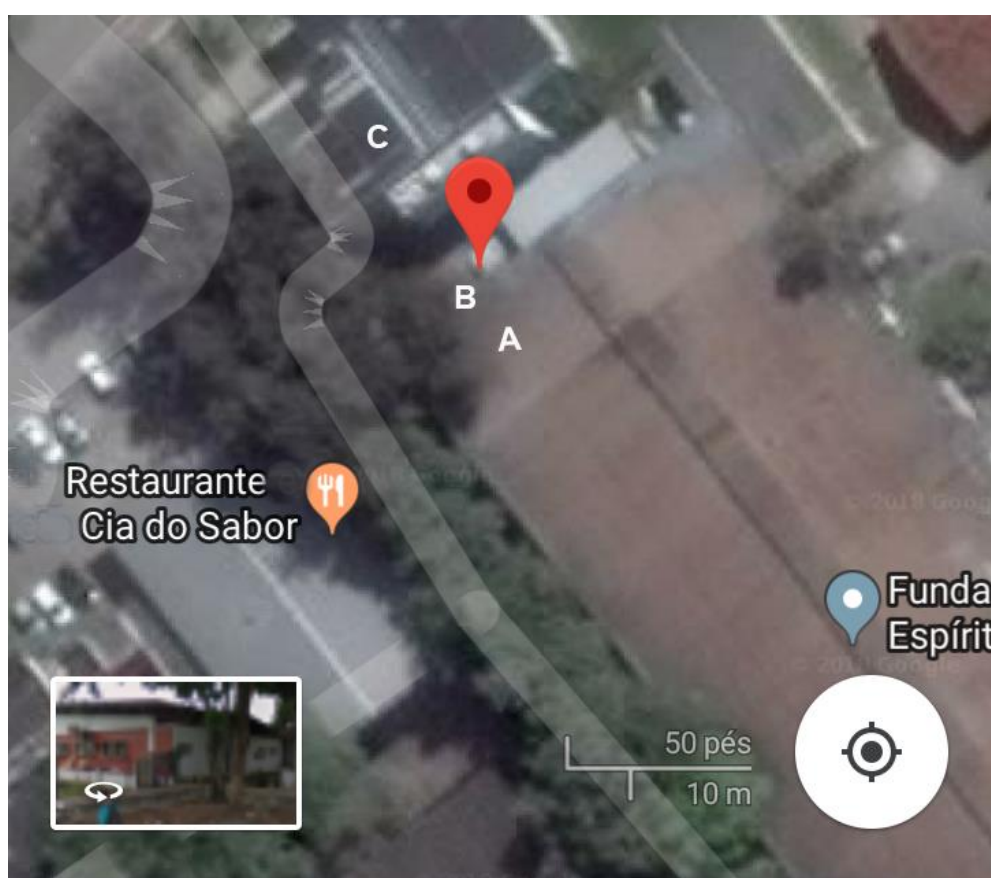
Os 5 (cinco) fotobiorreatores tubulares de acrílico transparente com capacidade individual de 30L ficaram instalados numa área externa ao LabSan (FIGURA 4.1.2a), propriedade do Departamento de Engenharia Ambiental da UFES. Os FBR foram posicionados em um suporte com inclinação de 60°, que segundo Catrillo *et al.* (2018) é uma angulação que permite boa captura da irradiação solar ao longo de todo o dia.

Cada FBR foi preenchido com os 350 mL do inóculo de microalgas pré-cultivado (item 4.1.1) e aproximadamente 25 L de efluente de UASB. Para os FBR, o efluente foi coletado também na ETE de Araçás e não passou por processos de filtração. O efluente foi coletado em

bombonas de plástico e mantidos em repouso durante 48 horas para decantação natural antes de sua utilização nos FBR.

O crescimento das microalgas nos FBR foi realizado com regime dia/noite, temperatura ambiente (FIGURA 4.1.2b), recebendo aeração no período diurno (8 – 16h) através de um compressor de ar Boyu ACQ-003 (China) com capacidade de até 60 L/min. Avaliou-se, diariamente, parâmetros como a temperatura, pH (Akso AK103), turbidez (HACH 2100P) e o crescimento das microalgas foi avaliado através da densidade óptica (DO) a 750 nm (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec 1000) (SALIM *et al.* 2011; JEBALI *et al.*, 2015) e clorofila-*a* (Aquafluor 8000-010) dos cinco FBR diariamente.

No total, foram 4 repetições das etapas descritas nos itens 4.1.1 e 4.1.2. A cada coleta de biomassa, o volume de 25 mL da cultura de microalgas era retirado de cada FBR para dar início a um novo cultivo em cada fotobiorreator. Esta fase de cultivo ocorreu durante os meses de janeiro, fevereiro e março de 2018.



**FIGURA 4.1.2a.** Localização do crescimento das microalgas nos fotobiorreatores. A – Laboratório de Saneamento, B – Local de instalação dos fotobiorreatores e C – CT VIII, Engenharia Ambiental. Latitude - 20,2718912 Longitude -40,3057983. **Fonte:** Google Maps ©2018 Versão 9.82.2.



**FIGURA 4.1.2a.** Fotobiorreatores de cultura microalgácea em efluente de tratamento de esgoto doméstico. Cultivos em ambiente externo sob iluminação natural e aeração artificial.

## 4.2 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

A recuperação das microalgas foi realizada através da técnica de coagulação-floculação (MOLINA-GRIMA *et al.*, 2003) seguindo os ensaios de Francisco (2016) e Cassini *et al.* (2017). Foram utilizados os coagulantes Tanino Modificado Tanfloc<sup>®</sup> Pop (TM) da Tanac S.A., Amido Catiônico de Mandioca (AC) Superior<sup>®</sup> 300 da Horizonte Amidos e o Sulfato de Alumínio (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) (AS) da Dinâmica Química Contemporânea LTDA, além da biomassa obtida por sedimentação natural (SN). Todos os coagulantes foram doados pelos seus fabricantes gratuitamente à UFES.

Cassini *et al.* (2017) obtiveram resultados ótimos para a coagulação considerando dosagens específicas de cada coagulante e controle de pH (TABELA 4.2a). Neste estudo, não houve alteração do pH do cultivo no momento da coagulação, pois o pH dos cultivos nos FBR encontrava-se dentro da faixa ótima para a recuperação. A dosagem de todos os coagulantes foi igual (80 mg/L), resultado da média da dosagem ótima dos três coagulantes sugerida no estudo supracitado. Além disso, a dosagem semelhante de todos os coagulantes visou a equidade na comparação do volume final de biometano gerado pela DA da BMA coagulada com os diferentes coagulantes.

**TABELA 4.2a.** Eficiência máxima de remoção (%) de BMA para cada coagulante.

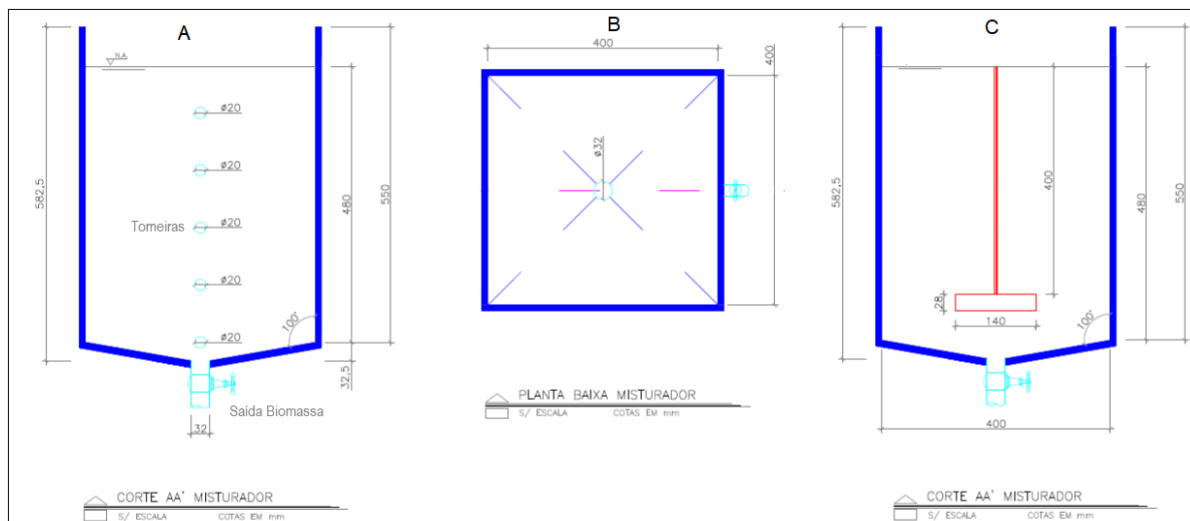
COAGULANTE	DOSE (mg/L)	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO (%)
Sulfato de Alumínio	50,0	95,9
Tanino Modificado Tanfloc <sup>®</sup> pop	100,0	95,6
Amido Catiônico Superior <sup>®</sup> 300	80,0	92,5

**Fonte:** Modificado de Cassini *et al.* (2017).

A solução de AC foi obtida pela dissolução do pó de amido modificado em água destilada a 60 °C com agitação magnética até a formação de um fluido gelatinoso (CASSINI *et al.*, 2017). As soluções de TM e AS foram obtidas da mesma forma, porém, sem aquecimento. Os coagulantes foram adicionados diretamente no cultivo de microalgas depositado num misturador similar a um *JarTest*, com capacidade de 40 L (FIGURA 4.2a e b).

Ao adicionar a solução coagulante, realizou-se a mistura rápida a 100 rpm durante 1 minuto e mistura lenta (30 rpm por 15 minutos) (LOGANATHAN, SATHTHASIVAM, SORP, 2018). A BMA

permaneceu em decantação por volta de 1 (uma) hora após a coagulação, em seguida foi coletada em béqueres com volume de 1L, transferida para frascos vedados e armazenada em refrigeração ( $20 \pm 2$  °C) até sua utilização.



**FIGURA 4.2a.** Esquema do misturador utilizado para o processo de CFS das microalgas. A – mostra detalhes das torneiras para retirada do efluente e da saída para coleta de biomassa, B – oferece uma vista da planta baixa e C – mostra o encaixe do misturador dentro do jarro. **Fonte:** as plantas foram planejadas e cordialmente cedidas por Sara Francisco. [contém modificações].



**FIGURA 4.2b.** Misturador utilizado para o processo de CFS das microalgas. É um misturador similar a um teste de jarro, contendo torneiras para retirada do efluente após a coagulação e um coletor no fundo para retirada da biomassa (FIGURA 4.2a – A).

### 4.3 PRÉ-TRATAMENTO

Parte da BMA concentrada com os coagulantes e sedimentada naturalmente passou por hidrólise alcalina com adição de NaOH (Hidróxido de Sódio, Synth, 97% de pureza). O procedimento hidrolítico foi uma adaptação de Yang *et al.* (2010) feita por Lamberti (2017) utilizando NaOH 1M até que a BMA atingisse o pH 10, a 27°C em chapa com agitação durante o tempo de 120 minutos; pHmetro AKSO® AK103, com eletrodo Sensorex® para sólidos e eletrodo com controle de temperatura. Outra porção de cada biomassa manteve-se apenas coagulada e sedimentada, sem hidrólise.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A caracterização da biomassa foi executada como descrito na TABELA 4.4a. Todos os parâmetros foram executados na biomassa coagulada e na biomassa coagulada e hidrolisada, assim como em seus sobrenadantes após centrifugação (Hermle Z320) a 4000 rpm por 10 minutos.

**TABELA 4.4a.** Métodos para caracterização da biomassa coagulada antes e depois da hidrólise.

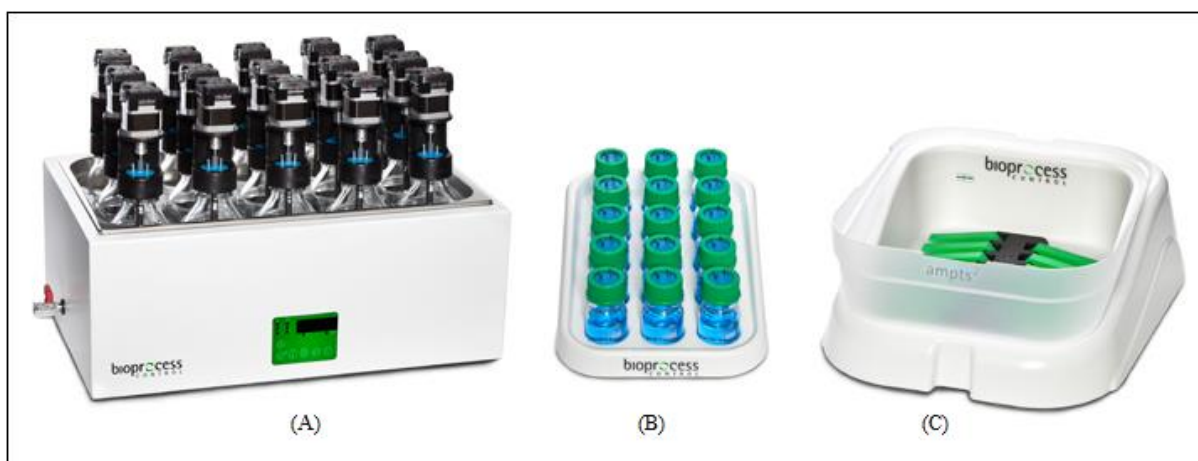
PARÂMETRO	UNIDADE	MÉTODO	REFERÊNCIA
DQO	mg/L O <sub>2</sub>	5220 C	
Nitrogênio Total NTK	mg/L N	4500 C	APHA, AWWA, WEF, 2005
Sólidos Totais	mg/L	2540 A	
Sólidos Voláteis Totais	mg/L	2540 A	
Carboidratos	mg/L	Espectrofotometria	DUBOIS <i>et al.</i> , 1956
Lipídeos	mg/L	Infravermelho	BLIGH & DYER, 1959

Para proteínas, obteve-se o valor de Nitrogênio Total de Kjeldahl (NTK) e aplicou-se o valor de conversão para proteínas 5,95 sugerido por López *et al.* (2010). A extração de lipídeos foi realizada aplicando clorofórmio, metanol e hexano, metodologia de Bligh & Dyer (1959), com leitura realizada no TOG/TPH Analyzer InfraCal da Wilks Enterprise (Óleos e graxas totais / Hidrocarbonetos Totais de Petróleo), que utiliza infravermelho na leitura (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Todos os valores para todos os parâmetros foram convertidos de mg/L para a unidade g/L.

#### 4.5 A PRODUÇÃO DE BIOMETANO ATRAVÉS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

A produção de biometano da biomassa foi medida usando o AMPTS II (*Automatic Methane Potential Test System*) da Bioprocess Control Sweden AB (FIGURA 4.5a). O equipamento mede a produção de biometano de modo similar ao método volumétrico descrito por (AQUINO *et al.*, 2007), porém, é automatizado. Os ensaios foram realizados em duplicata e triplicata visando a acomodação de todos os tratamentos nos 15 (quinze) reatores do equipamento. Cada frasco biodigestor de 500mL foi preenchido até o volume limite de 400mL seguindo a proporção S/I de 0,5 g DQO / g SV do lodo de UASB e da BMA (ALZATE *et al.*, 2012; ESPOSITO *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013).

O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, os 15 biodigestores do AMPTS receberam uma mistura de lodo de UASB, soluções, água e BMA coagulada em diferentes quantidades (TABELA 4.5a). A segunda etapa consistiu de uma repetição da primeira, exceto que foi utilizada BMA coagulada e hidrolisada (TABELA 4.5b). A configuração dos controles foi disposta como segue: lodo de UASB e água – Controle do Inóculo; lodo de UASB, acetato de sódio (30 mg/L) e água – Controle Positivo; Lodo e BMA SN – Controle Negativo, sem coagulantes.



**FIGURA 4.5a.** (A) Banho de água com temperatura regulável e reatores anaeróbios com misturadores automáticos onde são inseridos os produtos para digestão. (B) Células de lavagem do biogás, onde o CO<sub>2</sub> é capturado pela solução de NaOH 3M e passa somente o biometano para a unidade C. (C) Unidade de medição de volume de gás. É para onde o biometano flui e levanta as campânulas que registram no *software* o volume gás. Os gases fluem entre as partes A, B e C através de mangueiras Tygon© impermeável a gases. Fonte: modificado de BIOPROCESS CONTROL SWEDEN AB (2016).

Seguindo as orientações de Aquino *et al.* (2007) de que a Atividade metanogênica Específica deve ser executada com excesso de nutrientes, adicionou-se as seguintes soluções: Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 g/L), Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$  10 g/L), Solução macronutriente ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g/L,  $\text{MgCl}_2$  2 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 g/L e  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L), Solução micronutriente ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  400 mg/L,  $\text{ZnCl}_2$  10 mg/L,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6 mg/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  100 mg/L,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  400 mg/L,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2 mg/L) e Ácido clorídrico ( $\text{HCl}$  1:10) (AQUINO *et al.*, 2007). O pH de cada frasco ficou entre 7,0 e 8,1, sendo ajustados até ficarem entre 7,0 e 7,4, faixa ideal para a DA (TABELAS 4.5a e 4.5b).

**TABELA 4.5a.** Configuração dos ensaios nos 15 biodigestores do AMPTS II com biomassa sem pré-tratamento.

Código	Repetições	Inóculo*	Substrato*	Acetato*	Cloreto de Amônio*	Bicarbonato de sódio*	Macro Nutrientes*	Micro Nutrientes*	HCL 1:10*	H <sub>2</sub> O*	TOTAL*
LD	2		0	-						266,4	400
LDA	2		0	53,3						213,1	400
SN	2	43,6	11,95	-	20	40	20	2	8	254,5	400
AC	3		14,6	-						251,8	400
TM	3		60,15	-						206,3	400
AS	3		72,07	-						194,3	400

\*Valores em mL. **LD:** lodo; **LDA:** lodo + acetato; **SN:** BMA sedimentação natural; **AC:** BMA amido catiônico; **TM:** BMA tanino modificado e **AS:** BMA sulfato de alumínio.

**TABELA 4.5b.** Configuração dos ensaios nos 15 biodigestores do AMPTS II com biomassa com pré-tratamento de hidrólise alcalina.

Código	Repetições	Inóculo*	Substrato*	Acetato*	Cloreto de Amônio*	Bicarbonato de sódio*	Macro Nutrientes*	Micro Nutrientes*	HCL 1:10*	H <sub>2</sub> O*	TOTAL*
LD	2		0	-						250	400
LDA	2		0	53,3						196,7	400
SNH	2	60	11,6	-	20	40	20	2	8	238,4	400
ACH	3		19,1	-						230,9	400
TMH	3		17,1	-						232,9	400
ASH	3		69,6	-						180,4	400

\*Valores em mL. **LD:** lodo; **LDA:** lodo + acetato; **SNH:** BMA sedimentação natural hidrolisada; **ACH:** BMA amido catiônico hidrolisada; **TMH:** BMA tanino modificado hidrolisada e **ASH:** BMA sulfato de alumínio hidrolisada.

Após a montagem dos reatores, foi realizada a purga dos gases presentes nos frascos através da injeção de nitrogênio gasoso por 10 minutos. Os 15 reatores ficaram sob agitação automatizada a 120 rpm em sentido horário e anti-horário e em banho de água a 35 °C. O tempo de retenção dos inóculos em cada reator nestas condições foi variável, determinado pela cessão de produção de gás, acompanhada diariamente através do *software* embutido no AMPTS II (FIGURA 4.5b). Os valores de biometano gerados em cada biodigestor já são normalizados pelo equipamento e descritos em ml – mililitros.

A atividade metanogênica específica (AME) foi calculada através da produção acumulada de metano, baseando-se na equação 4.5a sugerida por Aquino *et al.* (2007). O resultado é dado em  $\text{gDQO}_{\text{CH}_4} / \text{gSSV.d}$ . Para cálculos da AME foi utilizado o Microsoft Office Excel 2016.

$$\text{Equação (4.5a) } AME = dV / dt$$

Em que:

$dV$  é o volume máximo acumulado de metano

$dt$  é o tempo de incubação do inóculo

Para avaliar a existência de diferença significativa entre as médias das amostras foi realizada análise de variância – ANOVA, enquanto que o teste de Tukey foi executado para comparar os tratamentos entre si e verificar se são estatisticamente iguais ou não. Todas as análises foram executadas no Bioestat® 7.0 *StatSoft South America*.

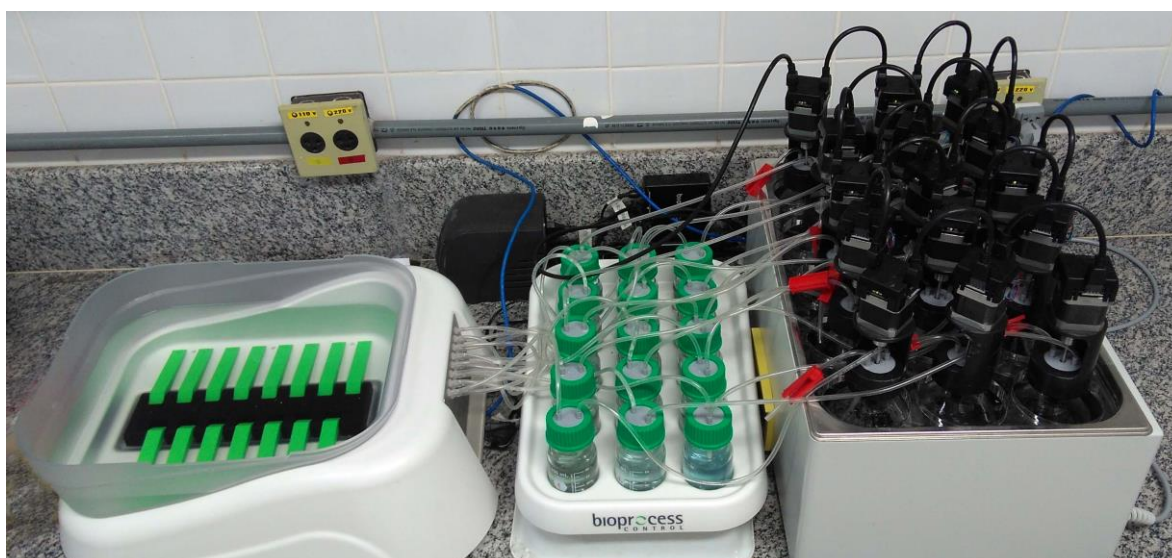


FIGURA 4.5b. AMPTS II em funcionamento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

O tempo médio de crescimento das microalgas nos fotobiorreatores foi de 8 (oito) dias (FIGURA 5.1a). Todos os FBR apresentaram queda na DO devido tempo nublado que ocorreu no segundo dia de cultivo. O ápice do desenvolvimento das microalgas aconteceu no dia 7 (sete). Zhao, Ma e Liu (2018) explicam que a irradiação luminosa afeta diretamente o crescimento das microalgas, inibindo ou incrementando a taxa fotossintética e, conseqüentemente, a produção de biomassa.

As taxas de clorofila-*a* acompanharam o crescimento observado através da DO. A contagem celular na câmara de Neubauer (Microscópio óptico Zeiss Axioplan HBO 50) apontou cerca de 4,56 milhões células/mL. O pH médio dos cultivos foi 10,6, variando de 9,3 a 11,6 ( $\sigma = 0,5$ ), enquanto que a temperatura média dos cultivos se manteve em torno de  $30,9 \pm 2$  °C ao longo dos oito dias de crescimento. Tan *et al.* (2018) afirma que é difícil fixar um pH específico para o cultivo de microalgas, porém, a variação de 6 a 8 são consideradas ideais. Além disso, ainda ressaltam que isso não é uma regra e que a maioria das espécies de microalgas podem apresentar tolerância a variações de pH.

O efluente utilizado no cultivo das microalgas passou por caracterização físico-química no primeiro dia do início cultivo nos FBR (Tabela 5.1a). Todos os valores encontrados, incluindo pH, DQO, DBO<sub>5</sub>, nitrogênio e fósforo estão dentro da faixa de variação descritas em Cavalcanti *et al.* (2001). Por influenciar na taxa de crescimento das microalgas, a qualidade do efluente é relevante no cultivo das microalgas, especialmente a disponibilidade de nutrientes (C, N, P) na forma em que as microalgas estão aptas a inserir em seu metabolismo.

Assim como descrito por vários autores, o tipo de coagulante na recuperação da biomassa pode influenciar na qualidade final da biomassa e de seus subprodutos (ANTHONY *et al.*, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2018). Como visto na TABELA 5.1b, a concentração de compostos orgânicos da BMA AS normalmente apresenta valores menores em relação às biomassas coaguladas por outros coagulantes, especialmente a SN e o AC. Choy *et al.* (2018) dizem que, apesar da eficácia comprovada dos coagulantes inorgânicos baseados em alumínio, a biomassa obtida pode apresentar baixo conteúdo de carboidratos e lipídeos. A composição orgânica das biomassas também pode ser vista na FIGURA 5.1b.

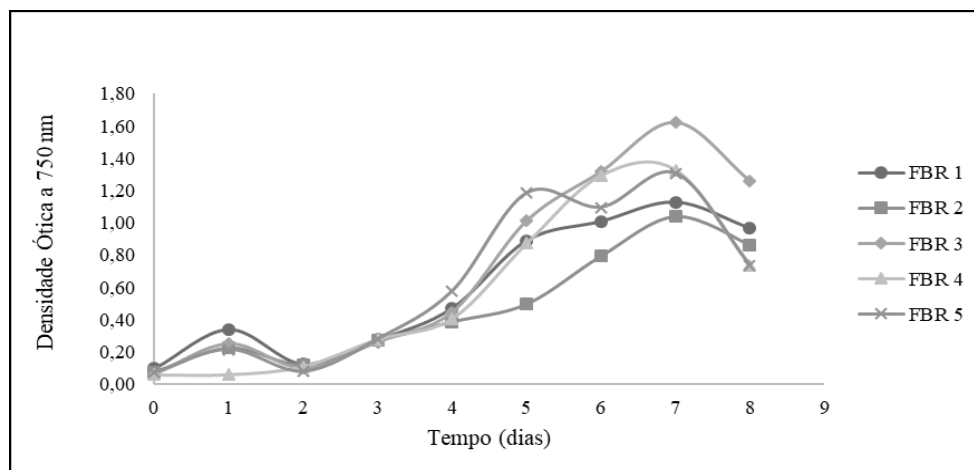


FIGURA 5.1a. Crescimento das microalgas nos cinco fotobiorreatores (FBR).

TABELA 5.1a. Caracterização do efluente de esgoto doméstico utilizado no crescimento das microalgas (n=3).

PARÂMETRO	UNIDADE	RESULTADO ( $\bar{x}$ )	$\sigma$	MÉTODO	REFERÊNCIA
pH	-	7,3	0,3	4500 B	
Turbidez	NTU	64,3	3,2	2130 B	
Alcalinidade Total	mg/L CaCO <sub>3</sub>	299,3	3,4	2320 B	
DQO	mg/L O <sub>2</sub>	118	4,1	5220 C	
DBO <sub>5</sub>	mg/L O <sub>2</sub>	80	3,4	5210 D	
Fósforo Total	mg/L P	2,1	0,8	4500 E	APHA, AWWA, WEF, 2005
Fósforo Dissolvido	mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,1	0,8	4500 D	
Nitrogênio Total NTK	mg/L N	58,1	4,3	4500 C	
Nitrogênio Amoniacal	mg/L NH <sub>3</sub>	50,6	1,5	4500 F	
Nitrato	mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,5	0,3	4500 H	
Sólidos Totais	mg/L	875,3	19,4	2540 A	
Sólidos Voláteis Totais	mg/L	134,7	2,9	2540 A	

TABELA 5.1b. Caracterização da biomassa coagulada, hidrolisada e de seus sobrenadantes (n=3).

Código	SVT	DQO	Carboidratos	Proteínas	Lipídeos
			g/L		
SN	43,1 ± 1,3	66,9 ± 0,3	3,6 ± 0	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,7
SNH	46,3 ± 3,0	69,0 ± 1,5	29,5 ± 5,9	10 ± 8,4	24,9 ± 9,1
SSN	-	5,9 ± 0,7	0,3 ± 0	0,7 ± 3,9	0,12 ± 0,0
SSNH	-	18,6 ± 6,5	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,5	0,14 ± 0,0
AC	28,0 ± 0,2	54,8 ± 0,3	3,6 ± 0,1	3,0 ± 0	2,2 ± 0,2
ACH	24,3 ± 0,7	41,8 ± 0,5	11,8 ± 0,9	7,0 ± 0,1	3,7 ± 5,8
SAC	-	9,0 ± 3,8	1,2 ± 0,4	0,7 ± 0	0,13 ± 0,0
SACH	-	10,5 ± 2,9	1,9 ± 0	0,7 ± 0,4	0,13 ± 0,0
TM	14,8 ± 0,7	13,3 ± 0,1	1,7 ± 0,4	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,9
TMH	14,1 ± 1,2	46,8 ± 6,1	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,9	0,9 ± 0,0
STM	-	2,9 ± 0,7	0,1 ± 0	0,4 ± 0,3	0,11 ± 0,0
STMH	-	6,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0	0,11 ± 0,0
AS	10,9 ± 0,1	11,1 ± 0,4	2,8 ± 0,2	4,0 ± 0,1	0,1 ± 1,7
ASH	6,7 ± 0,5	11,5 ± 2,5	5,5 ± 0,5	2,4 ± 0,4	0,9 ± 1,4
SAS	-	2,6 ± 8,4	0,1 ± 0,9	0,8 ± 11,8	0,17 ± 0,0
SASH	-	6,8 ± 2,2	0,2 ± 0	0,4 ± 0,1	0,14 ± 0,0

LEGENDA: SN – Biomassa sedimentação natural; AC – Biomassa amido catiônico; TM – Biomassa tanino modificado; AS – Biomassa sulfato de alumínio; SNH, ACH, TMH, ASH – Biomassas Hidrolisadas; SSN, SAC, STM, SAS – Sobrenadantes da biomassa; SSNH, SACH, STMH, SASH – Sobrenadantes da biomassa hidrolisada.

As diferenças entre os tratamentos são nítidas. A BMA SN, pura e sem adição de coagulante ou qualquer outra substância mostrou-se como uma biomassa com características superiores, alta densidade de ST, SVT e SSV que chegam a ser três vezes maior do que a BMA AS, considerada padrão no tratamento de água e efluentes. Porém, tais características não são suficientes para fazer com que o método de sedimentação natural seja largamente utilizado devido ao grande espaço necessário, tempo longo de decantação e dificuldade na coleta da biomassa.

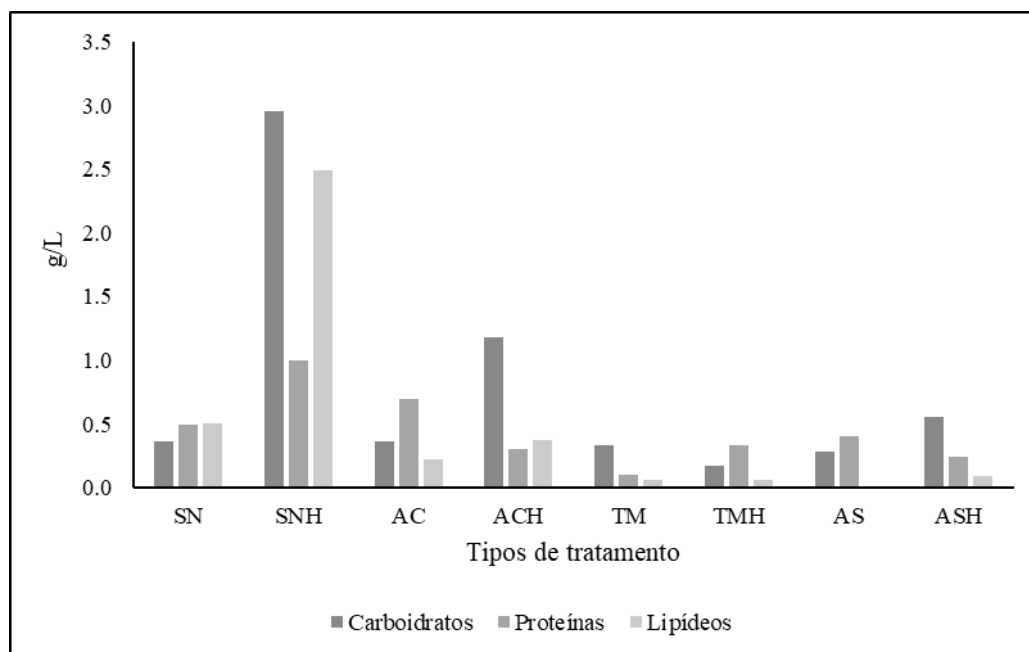
Após a aplicação do pré-tratamento de hidrólise alcalina com NaOH, nota-se o aumento da matéria orgânica disponível em todos os tipos de biomassa, visto que o aumento da DQO solúvel indica maior solubilização de matéria orgânica (Li *et al.*, 2012). A biomassa AS e suas variações, mostraram valores menores após a hidrólise nos ensaios de proteínas. Isso pode ocorrer devido à volatilidade do nitrogênio ao ambiente mais alcalino. Nos ensaios de lipídeos, a BMA AS e variações também apresentou pouco aumento ou valores similares antes e depois hidrólise. Salim *et al.* (2011) expõem que os processos de floculação, independente do tipo de coagulante, podem induzir mudanças indesejadas na composição celular da biomassa, sugerindo outras técnicas de recuperação da biomassa.

Observando a FIGURA 5.1b fica clara a diferença na composição orgânica das biomassas obtidas através de diferentes coagulantes. Na colheita foram recuperados volumes equivalentes de biomassa de cada um dos 5 (cinco) fotobiorreatores para garantir que todos os tratamentos tivessem porções de todos os fotobiorreatores de cultivo. Porém, mesmo assim, as biomassas mostram valores diferentes entre as proporções de carboidratos, lipídeos e proteínas, que podem ser atribuídos ao tipo de coagulante utilizado na recuperação. Após a hidrólise as diferenças mostram-se do mesmo modo distintas.

Análises realizadas somente com as soluções de coagulantes (Amido catiônico de mandioca, tanino modifica e sulfato de alumínio) não foram conclusivas para caracterizar cada tipo de coagulante. Mesmo repetindo diversas análises por várias vezes, os valores mostraram-se discrepantes e inconclusivos. Estudos mais aprofundados e métodos de caracterização mais acurados podem ser aplicados aos coagulantes para poder inferir a sua real contribuição na composição da biomassa recuperada.

A BMA SNH foi o tratamento que revelou melhor solubilização de compostos orgânicos, seguida pela BMA ACH. É importante ressaltar que nem mesmo as composições ideais entre série de sólidos, DQO, carboidratos, lipídeos e proteínas são capazes de garantir com

rendimento de biometano durante a digestão anaeróbia. Outras características como a temperatura do biodigestor, o pH do meio, disponibilidade de nutrientes e a saúde do inóculo são consideradas fundamentais para a boa produtividade deste biocombustível.



**FIGURA 5.1b.** Relação de compostos orgânicos presentes na biomassa microalgácea antes e depois da hidrólise. **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio; **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

## 5.2 PRODUÇÃO DE BIOMETANO DA BIOMASSA COAGULADA SEM PRÉ-TRATAMENTO

O inóculo (LD) exibiu produção média de 16,2 mL CH<sub>4</sub> / g SV, enquanto que o controle positivo LDA (Lodo+Acetato) apresentou a maior taxa média de produção de biometano, chegando a 270,5 mL CH<sub>4</sub> / g SV ao longo de 33 dias de experimento. As biomassas obtidas pela sedimentação natural (SN – controle negativo, biomassa sem adição de coagulantes) e através da coagulação com Amido catiônico (AC), Tanino modificado (TM) e sulfato de alumínio (AS) renderam os valores 45,3; 54,2; 120,4 e 56 mL CH<sub>4</sub> / g SV, respectivamente (FIGURA 5.2a). Para mensurar apenas o volume produzido pelas biomassas foi subtraído o valor produzido pelo inóculo.

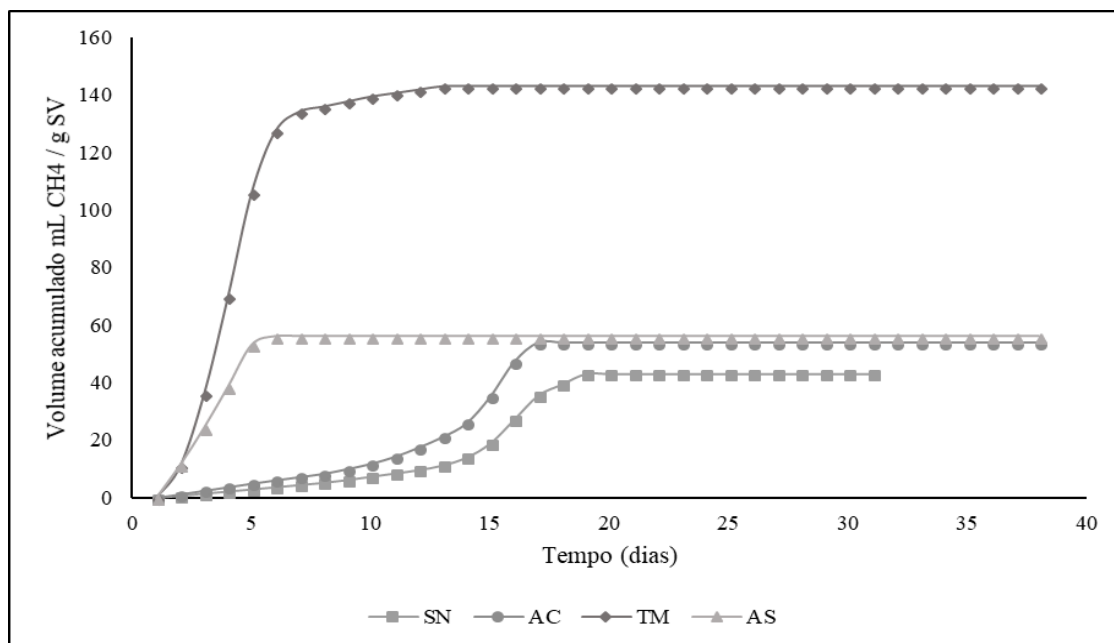
A atividade das BMA SN e AC são bastante similares, ambas iniciam com baixa produção de biometano, aumentando gradualmente e chegando ao pico de produção entre os dias 16 e 17 (16,3 e 14,3 mL CH<sub>4</sub> / g SV, concomitantemente). Ambas também decrescem em tempos parecidos, enquanto que a BMA SN manteve sua atividade por mais alguns dias (FIGURA 5.2a e b). Ras *et al.* (2011) alcançaram 240 mL CH<sub>4</sub> / g SV ao longo de 28 dias de retenção em biodigestor anaeróbio com uma biomassa predominante de *C. vulgaris* sedimentada naturalmente.

González-Fernández *et al.* (2011b) e Ras *et al.* (2011) afirmam que os gêneros *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. possuem a parede celular rica em carboidratos, tornando desafiadora a utilização de sua biomassa na produção de biocombustíveis. A rigidez da parede celular pode explicar a lenta atividade no início da biodigestão, especialmente a BMA AC, que além dos carboidratos já presentes na parede celular, ainda recebeu uma carga de amido do coagulante.

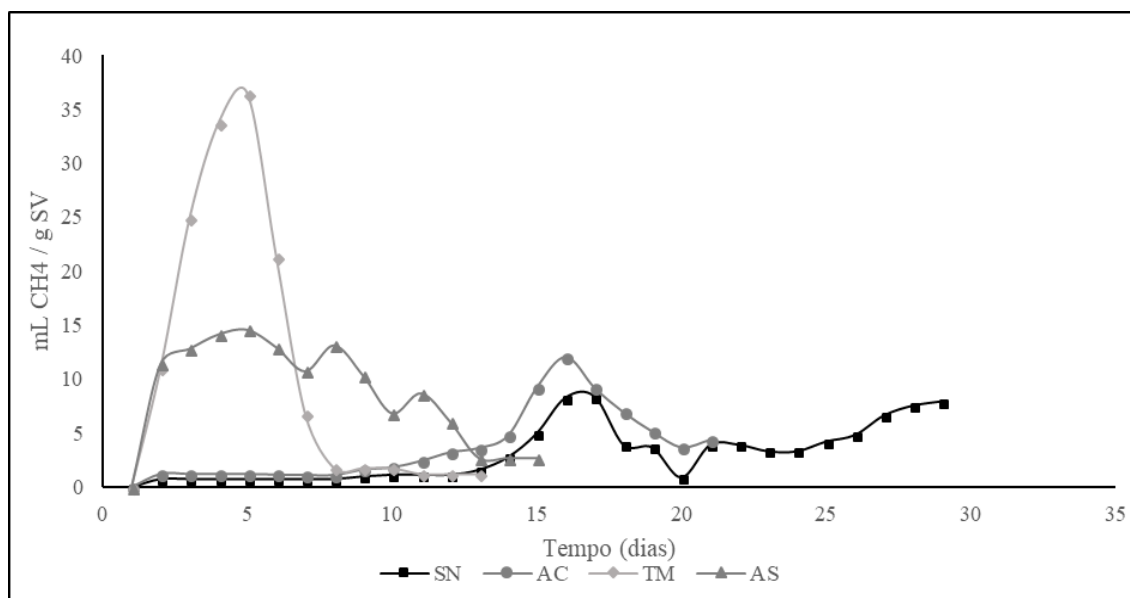
A investigação de Mussnug *et al.* (2010) sobre o efeito da composição celular das microalgas na DA mostrou que espécies com parede celular com baixo teor de proteínas mostraram maior produção de biometano, da mesma forma que as espécies contendo baixo teor de carboidratos na parede celular. Na Tabla 5.1b é possível notar que as BMA SN e AC são as que possuem os maiores teores destes dois compostos, coincidindo com a menor teor de biometano produzido por estes tratamentos.

Os tratamentos BMA TM (37,7 mL CH<sub>4</sub> / g SV) e AS (14,6 mL CH<sub>4</sub> / g SV) mostraram o maior volume diário de produção de biometano. Ambos atingiram o pico de produção logo no início do experimento, já no 5º (quinto) dia (FIGURA 5.2b). A curta atividade nos

biodigestores contendo BMA AS pode ser explicada pela possível inibição da DA provocada pelo Alumínio presente no coagulante (ANTHONY *et al.*, 2013).



**FIGURA 5.2a.** Produção acumulada de biometano através da biodigestão de biomassas recuperadas por diferentes coagulantes. **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio



**FIGURA 5.2b.** Produção diária de biometano através da biodigestão de biomassa microalgácea coagulada através de coagulantes químicos e naturais. **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio

A BMA TM e AS apresentaram os menores tempos de retenção da atividade anaeróbia nos biodigestores (12 e 14 dias respectivamente). Apesar da breve atividade nos biodigestores anaeróbios, BMA TM mostrou o maior volume médio de biometano produzido dentre os tratamentos. Este rendimento considerável de biometano e o aumento progressivo no volume produzido sugere uma alta atividade endógena da microfauna anaeróbia (CONVERTI *et al.*, 2009), uma vez que não houve alimentação dos biodigestores ao longo do experimento.

Liu *et al.* (2016) relatam que o alto teor de sólidos na biomassa pode desencadear longo tempo de retenção no biodigestor anaeróbio, além de poder reduzir a taxa de produção de biometano. Neste ensaio, as BMA SN e AC foram as que apresentaram maior teor de sólidos e, conseqüentemente, menor rendimento de biometano, assim como longo tempo de atividade anaeróbia. Por outro lado, BMA TM e AS mostraram as maiores taxas de produção de biometano e baixo tempo de retenção e baixo teor de sólidos (TABELA 5.1b).

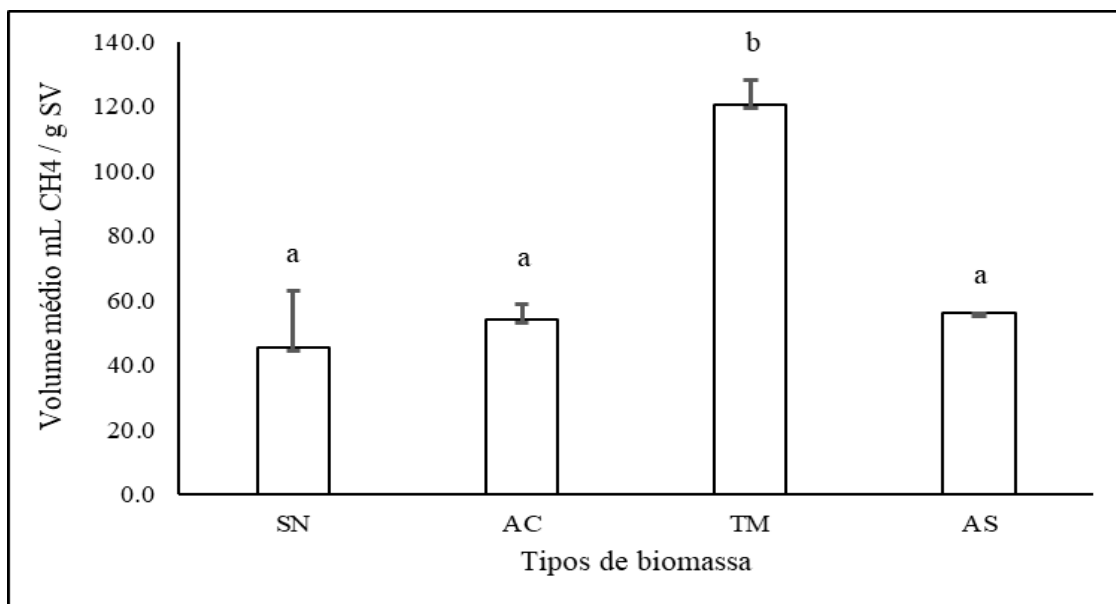
Comparando com outros tratamentos, o baixo teor de proteínas e lipídeos exibido pela BMA TM pode ter sido um fator que contribuiu para o alto rendimento de biometano. Em alta quantidade, estes compostos nitrogenados podem provocar inibição da DA pela elevada liberação de amônio e ácidos graxos voláteis (SIALVE *et al.*, 2009; SARATALE *et al.*, 2018). Coincidentemente, BMA SN e AC exibiram o maior teor de proteínas e foram os tratamentos que tiveram o menor rendimento de biometano (TABELA 5.1b).

Em alguns casos, nenhum tipo de hidrólise é necessário para um bom desempenho na produção de biometano (SARATALE *et al.*, 2018). Hou *et al.* (2018) descobriram que, além de ser um excelente coagulante e ambientalmente amigável, TM protege as células das algas para que não liberem substâncias na água. Porém, esta capacidade de manter as células integras ocorre somente até por volta de 8 (oito) dias, sendo que após esse período as células passam por lise e sua parede celular apresenta danos. Tal fato também pode ter contribuído para o despontamento da produção de biometano pela BMA TM.

A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey não mostraram diferença significativa entre os volumes de biometano produzidos por SN, AC e AS ( $p=0,04$ ). Apenas a BMA TM mostrou-se diferente estatisticamente das demais (FIGURA 5.2c). Gutiérrez *et al.* (2015a) testaram a produção de CH<sub>4</sub> da BMA TM e tiveram resultados similares à BMA SN. Os autores concluíram que este coagulante não apresentou efeitos negativos na produção de biometano. Assim, TM mostra-se como um excelente coagulante para a biomassa microalgácea e na produção de biometano.

Diferentemente de Gutiérrez *et al.* (2015a), nesta pesquisa a BMA TM mostrou-se significativamente diferente da BMA SN e como a biomassa com melhor rendimento na produção de biometano, especialmente pelo coagulante ser rápido e eficaz no processo de CFS e por não demonstrar inibição no processo de DA. BMA SN (controle negativo) e TM apresentaram uma diferença de  $p < 0,01$ .

O inóculo (LD) apresentou diferença significativa apenas com o controle positivo (LDA), que é estatisticamente diferente de todas as amostras, exibindo um perfil elevado de produção de biometano (dados não mostrados). Assim como evidenciado neste experimento, Aquino *et al.* (2007) explicam que o acetato é um dos melhores substratos na avaliação da atividade metanogênica das arqueias.



**FIGURA 5.2c.** Produção média de biometano gerado. **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio.

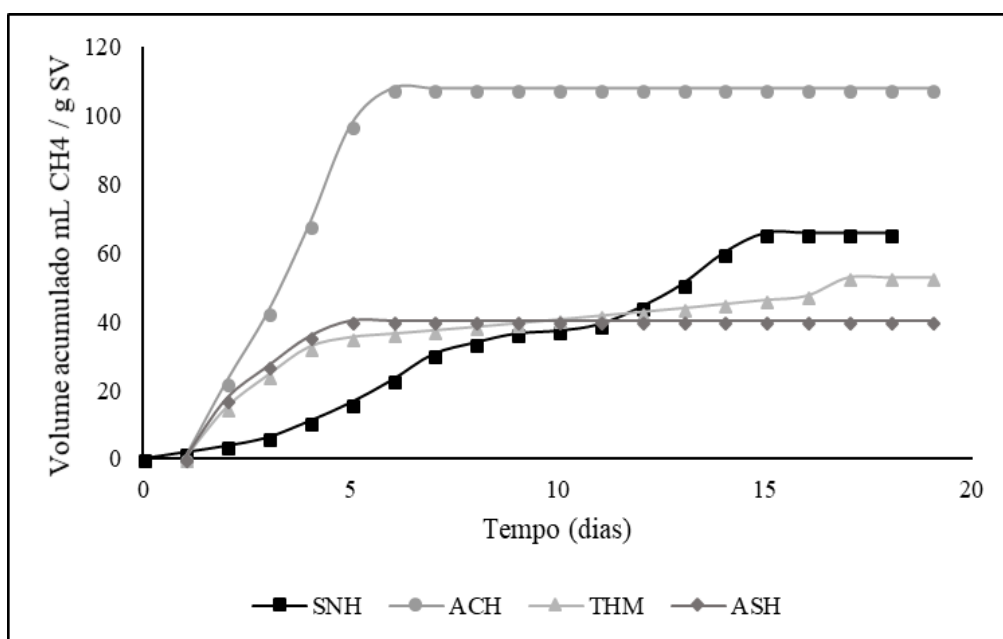
Passando da escala laboratorial para a produção real em uma planta de produção de bioenergia, não faria diferença utilizar o método de recuperação sedimentação natural ou os coagulantes AC e AS. Contudo, a CFS é um método muito mais rápido de se obter biomassa do que a sedimentação natural, além de exigir menos espaço físico. Mesmo que os coagulantes, especialmente os inorgânicos, possam provocar algum efeito ou alteração na biomassa, são tecnologias que viabilizam a produção de biometano através da biodigestão anaeróbia ou outros tipos de produção de diferentes biocombustíveis.

### 5.3 PRODUÇÃO DE BIOMETANO DA BIOMASSA COAGULADA E HIDROLISADA

O rendimento médio de LD mostrou produção de 22,1 mL CH<sub>4</sub> / g SV, enquanto que LDA reduziu sua produção de mais de 270 mL CH<sub>4</sub> / g SV para 29,7 mL CH<sub>4</sub> / g SV. Lembrando que ambos não passaram por hidrólise (apenas as biomassas passaram pelo pré-tratamento), a diferença sugere baixa atividade endógena do lodo inoculado com acetato (LDA).

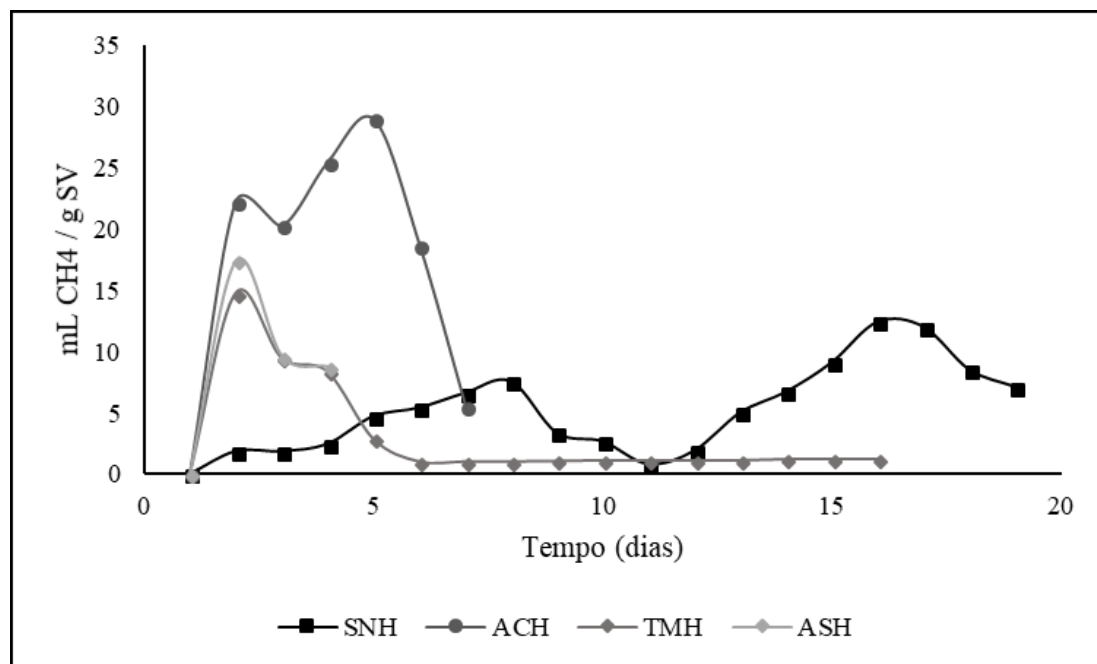
O controle negativo (BMA SNH) apresentou acúmulo de 65,7 mL CH<sub>4</sub> / g SV. As biomassas recuperadas através dos diferentes coagulantes e hidrolisadas tiveram produção média acumulada de 107,8 (ACH); 52,8 (TMH) e 40,4 (ASH) mL CH<sub>4</sub> / g SV. Com o pré-tratamento de hidrólise alcalina a BMA ACH despontou na produção de CH<sub>4</sub> (FIGURA 5.3a).

Após a hidrólise, a BMA SNH apresentou crescimento na taxa de produção de biometano (FIGURA 5.3a), efeito que é esperado, uma vez que o rompimento da parede celular aumenta a disponibilidade de matéria orgânica no meio (ver FIGURA 5.1b). Porém, como explica Cho *et al.* (2013), a produção de biometano pode ser melhorada através de fatores que não a hidrólise. A qualidade do inóculo e o controle de pH exercem função importante no controle da atividade biológica dos microrganismos.



**FIGURA 5.3a.** Produção acumulada de biometano através da biodigestão de biomassas recuperadas por diferentes coagulantes e hidrolisada via alcalina. **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

O tempo de atividade dos tratamentos hidrolisados nos biodigestores do AMPTS durou 19 (dezenove) dias, 10 (dez) dias a menos do que experimento com biomassa sem hidrólise. O tratamento com maior tempo de atividade foi a BMA SNH (19 dias), seguida por TMH (16 dias). As biomassas ACH e ASH apresentaram breve atividade, encerrando a produção de CH<sub>4</sub> nos dias 04 e 06 (FIGURA 5.3b).



**FIGURA 5.3b.** Produção diária de biometano através da biodigestão de biomassas recuperadas por diferentes coagulantes e hidrolisadas via alcalina. **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

Assim como no experimento sem hidrólise, a biomassa coagulada com sulfato de alumínio e hidrolisada (ASH) mostrou curta atividade e baixa produção de biometano, enfatizando que o coagulante pode inibir a DA (CHOY *et al.*, 2018). Todavia, não se sabe a intensidade da toxicidade do AS na biomassa. Choy *et al.* (*op. cit.*) realizaram um experimento de coagulação com AS na dosagem de 72 mg/L (apenas 8mg a menos do que a quantidade usada nesta pesquisa) e constataram que o residual de alumínio na biomassa era de 1,306 mg/L. Não há dados se esta quantidade é tóxica para os microrganismos da DA.

Utilizando a hidrólise alcalina com NaOH, Cho *et al.* (2013) elevaram o pH da biomassa de microalgas a 9, 11 e 13. Contudo, os autores concluíram que o gasto energético envolvido no pré-tratamento foi maior do que o volume de biometano produzido, recomendando que a

biomassa seja aplicada na forma bruta para a digestão anaeróbia, sem aplicação de pré-tratamentos hidrolíticos.

Comumente, os primeiros dias de digestão anaeróbia apresentam baixa produtividade de biometano devido à adaptação entre substrato e inóculo. É sabido que o pico de produção de biometano está relacionado com a alta da DQO solúvel, pois este aumento indica o aumento de matéria orgânica solubilizada (LI *et al.*, 2012), enquanto que outros picos de incremento na produção de biometano podem ser devido à degradação de compostos insolúveis, como proteínas não desnaturadas durante a hidrólise ou carboidratos de cadeia longa (ZHANG *et al.*, 2015).

A BMA SNH mostrou baixa atividade no início dos experimentos sem hidrólise (FIGURA 5.2b) e com hidrólise (FIGURA 5.3b). Mesmo havendo boa solubilização de compostos orgânicos na BMA SNH, como mostrado na FIGURA 5.1b, somente isso não foi suficiente para o início rápido da atividade de SNH. Devido à grande proporção de SVT e DQO deste tratamento, seu início foi retardado e sua produção aumentou substancialmente, mesmo após o longo período de adaptação no biodigestor.

O tratamento BMA ACH revelou alto rendimento de metano após o pré-tratamento de hidrólise alcalina. A carga inicial de amido fornecida pelo coagulante fez com que a produção de biometano fosse mais baixa no experimento sem hidrólise. Porém, a hidrólise foi capaz de solubilizar as moléculas de polissacarídeos em monômeros mais fáceis de serem digeridos pelo consórcio microbiano durante a digestão anaeróbia.

O efeito da hidrólise é diferente em cada tipo de biomassa, podendo gerar inibidores que afetam a produção do biocombustível (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Borges *et al.* (2011) concluíram que o AS inibiu a digestão anaeróbia de compostos orgânicos em seus experimentos. Mesmo que nesta pesquisa a BMA AS tenha tido ótimo rendimento na produção de biometano quando não hidrolisada. O resultado para BMA ASH mostrou o oposto, havendo queda no rendimento de biometano.

Zhang *et al.* (2015) testaram quantidades de 20, 40, 60 e 80 mg/L de NaOH no pré-tratamento e concluíram que a dosagem de 40 mg já era alta demais para incrementar a produção de biometano. As dosagens superiores provocaram inibição da digestão anaeróbia, possivelmente pelo excesso de íons  $\text{Na}^+$ . Neste trabalho, a dosagem utilizada de NaOH foi bem superior à utilizada por Zhang e seus colaboradores, cerca de 1,8g/L de NaOH.

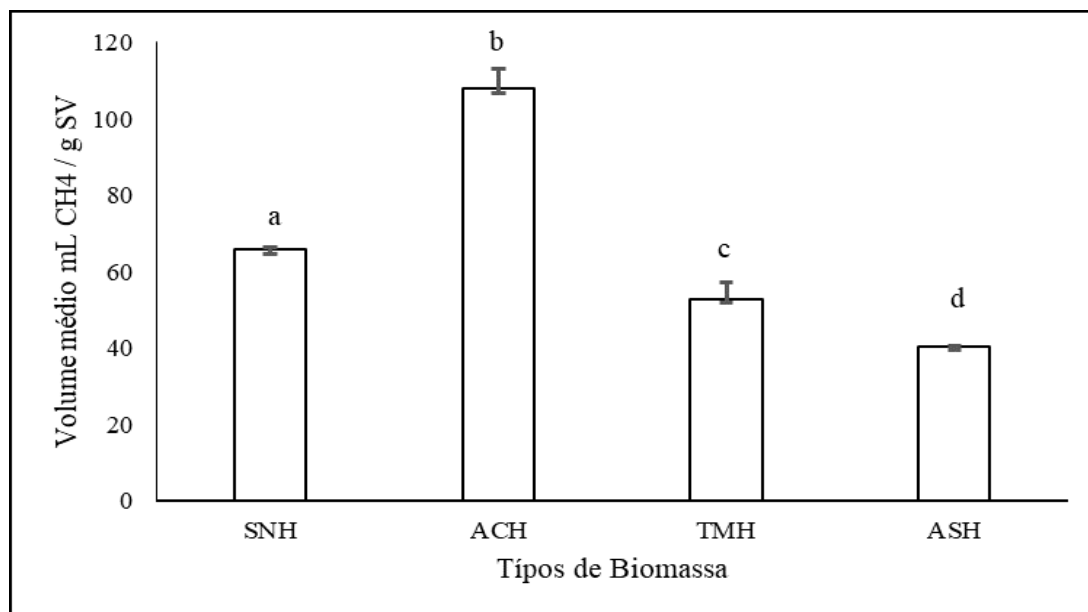
Porém, Lamberti (2017) utilizou destas mesmas concentrações de NaOH no pré-tratamento e Ferreira (2017) obteve bom rendimento de biometano após a hidrólise. Parece que as BMA SNH e ACH não passaram por efeitos inibitórios, uma vez que tiveram saltos na produção de biometano após a hidrólise. A interação entre biomassa, coagulante e tratamento hidrolítico pode ser um fator que, unidos, influenciaram no processo de digestão anaeróbia e, conseqüentemente, na produção de biometano.

Para o processo de hidrólise alcalina através da adição de um agente ácido, como o HCl, fez com que a produção de biometano aumentasse em 25% no trabalho de Li *et al.* (2012). Do contrário, quando o pH da biomassa foi mantido entre 8,4 e 8,8 a digestão anaeróbia mostrou retardo no início da atividade do inóculo. Logo, após a hidrólise alcalina é indicado que o pH seja ajustado para abaixo de 8, assim como realizado neste estudo, em que o pH foi corrigido para a faixa entre 7 e 7,5 (AQUINO *et al.*, 2007).

Tanto nos ensaios sem hidrólise (Item 5.2), quanto nestes contendo a biomassa hidrolisada, o pH sempre foi um quesito analisado rigorosamente ao longo dos experimentos. O pH do inóculo, dos substratos hidrolisados foram medidos individualmente dentro do frasco biodigestor. Além disso, após a adição de cada uma das soluções nutrientes inseridas nos biodigestores, o pH era novamente aferido e corrigido, caso fosse necessário.

Ao final da montagem dos reatores, o pH de todos foi novamente aferido e, por fim, foram iniciados os testes. Estes são cuidados essenciais para garantir o bom funcionamento do experimento, principalmente se tratando de ensaios tão delicados e cercados de tantas variáveis como é o processo de digestão anaeróbia. Mesmo assim, é impossível saber como cada uma das partes inseridas nos biodigestores reagiram após a mistura de todos os elementos, afinal, a digestão anaeróbia é um processo complexo e altamente dinâmico, em que mesmo com todas as variáveis controladas, os microrganismos podem reagir de maneiras distintas às condições do meio em que estão sendo avaliados.

Após a hidrólise, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa quando submetidos a ANOVA e Teste de Tukey (FIGURA 5.3c). Somente os controles LD e LDA tiveram diferença não significativa para produção de biometano. Partindo da prerrogativa que o interesse é maximizar a produção de metano e entender influências positivas e negativas no processo de DA, o tratamento BMA ACH pode ser considerado como o que apresentou o melhor incremento na produção de biometano.



**FIGURA 5.3c.** Produção média de biometano gerado pela biodigestão anaeróbia de biomassa coagulada e hidrolisada ( $p < 0,01$ ). **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

Tendo em vista a dissimilaridade entre os tratamentos após a hidrólise e visto que boa parte deles apresentaram aumento na produção de biometano (exceto BMA TMH), a escolha do método de recuperação da biomassa e do tipo de coagulante a ser utilizado precisa ser pautada em outros fatores que não a geração energética, como: características químicas do coagulante, eficácia, dosagem, custo, toxicidade, tempo de ação, carga poluidora desde sua fabricação até o seu uso final e sua contribuição para a balanço da digestão anaeróbia.

#### 5.4 BIOMASSA SEM PRÉ-TRATAMENTO *VERSUS* PRÉ-TRATADA

Yan *et al.* (2010) explicam que a hidrólise alcalina, além de ser prática, eficaz e viável em larga escala, além de ter baixo custo energético comparada à hidrólise térmica ou outras técnicas. Ao realizar hidrólise alcalina com NaOH nas mesmas condições que Lamberti (2017) e deste estudo, Ferreira (2017) obteve acréscimo de 29% na produção de CH<sub>4</sub> através da DA de biomassa coagulada com sulfato de alumínio e um resultado ainda melhor com a hidrólise térmica. Contudo, nesta pesquisa, a BMA ASH apresentou um valor 27,8% menor de produção de CH<sub>4</sub> do que a BMA AS, sem hidrólise (TABELA 5.4a).

Golueke *et al.* (1957) obtiveram aumento de 10% na produção de biometano, enquanto Chen e Oswald (1998), 33% após a aplicação de pré-tratamentos térmicos. Contudo, o aumento alcançado não foi suficiente para manter um balanço energético positivo do processo (SIALVE *et al.*, 2009). Mendéz *et al.* (2013) também concluíram que o balanço energético da produção de biometano com aplicação de pré-tratamentos à biomassa é energeticamente inviável.

**TABELA 5.4a.** Incremento na produção de CH<sub>4</sub> (mL / g SV) após hidrólise alcalina.

<b>BMA</b>	<b>S/ Hidrólise</b>	<b>C/ Hidrólise</b>	<b>% aumento</b>
SN	45,3	65,8	45,1
AC	54,2	107,8	98,8
TM	120,4	52,8	-56,1
AS	56,1	40,5	-27,8

Mendéz *et al.* (2013) também tiveram resultados melhores para a produção de biometano com a biomassa que passou por hidrólise alcalina, aumentando em 171% a produção de biometano. Eles concluíram que a hidrólise química (ácida e especialmente a alcalina) melhora o processo de digestão e a produção de biometano. Aplicando hidrólise ácido-básica, Anthony *et al.* (2013) descobriram que a biomassa coagulada com amido é mais eficaz não só na produção de biometano, mas também na produção de etanol, butanol e biodiesel do que a biomassa coagulada com sulfato de alumínio. Os resultados corroboram os obtidos nesta pesquisa, onde ACH mostrou rendimento de biometano 98,8% maior do que AC (sem hidrólise).

Assim como Ferreira (2017), Passos *et al.* (2016) obtiveram melhor rendimento de biometano quando aplicado o pré-tratamento térmico (aumento de 93%) quando comparado à hidrólise termoalcalina, que alcançou rendimento 73% maior do que a biomassa sem a hidrólise. Assim

como neste estudo, a composição orgânica e a solubilização de compostos orgânicos foram maiores após a hidrólise termoalcalina (TABELA 5.1b e FIGURA 5.1b).

Apesar do incremento de quase 50% no rendimento de biometano da BMA SNH, o método da sedimentação natural, apesar de vantajoso por não haver adição de químicos, nem gasto energético ou interferências na biomassa, é extremamente lento (levou-se 14 dias para obter a BMA SN nesta pesquisa) e exige grandes locais para decantação. Estas características tornam a sedimentação natural uma técnica inviável em larga escala (RAS *et al.*, 2011). Mesmo assim, ainda que a biomassa obtida apresente ótimas características físico-químicas (FIGURA 5.1b), a BMA SN e SNH apresentaram taxa menores de produção de biometano do que outros tipos de biomassa, como BMA TM e BMA ACH.

O coagulante, além de interferir no processo de coagulação de acordo com as características das microalgas e do meio de cultivo, também pode alterar na qualidade final da biomassa obtida e no seu uso e destino final. Letelier-Gordo *et al.* (2014) afirmam que os coagulantes orgânicos não deixam acúmulos de substâncias tóxicas na biomassa de microalgas, o que é benéfico tanto para o meio ambiente, quanto para o uso da biomassa para os mais diversos fins, como a produção de biometano.

Mesmo diante de tais afirmações é inegável que as diferenças entre os tratamentos tenha sido decorrente do tipo de coagulante utilizado ou método de recuperação. BMA SN mostrou melhores referências em todas as características analisadas. BMA SN, AC, TM e AS mostraram-se tão distintas em sua composição orgânica, sendo que todas foram obtidas em mesmas proporções nos cultivos nos FBR que a única fonte de diferenciação entre elas parece ser a contribuição do coagulante em sua composição. Após o pré-tratamento, tais distinções parecem ter ficado ainda mais ampliadas.

Gutiérrez *et al.* (2015) e Passos *et al.* (2016) concluíram que a recuperação de microalgas utilizando o tanino modificado é benéfica à biomassa e ao meio ambiente. Além disso, afirmam que a aplicação do coagulante não apresenta efeitos negativos no processo de digestão anaeróbia. O baixo rendimento de biometano da BMA TMH pode ser decorrente da melhor solubilização de proteínas através da hidrólise alcalina (aplicada neste estudo) em comparação com os carboidratos, que se solubilizam melhor através da hidrólise ácida. Este fato pode ter influenciado na liberação de nitrogênio amoniacal ou outros subprodutos tóxicos não identificados que reduziram a atividade das arqueias metanogênicas (MENDÉZ *et al.*, 2013).

No mais, Hameed *et al.* (2016) relataram que o coagulante à base de tanino modificado não é capaz de remover nitrogênio amoniacal da biomassa. Sabe-se que este composto é extremamente prejudicial à digestão anaeróbia e que as bactérias levam certo tempo para se adaptarem a este novo ambiente rico em nitrogênio. Os autores indagam que esta condição pode perturbar as bactérias oxidantes de amônia, que já possuem baixo crescimento e lenta taxa de degradação de substratos muito ricos em nitrogênio.

A drástica redução do rendimento de biometano da BMA TMH é outro fator intrigante. Como mencionado por Hou *et al.* (2018), inicialmente o tanino forma uma rede de proteção nos flocos da biomassa, que após uma semana se rompe e provoca lise celular. A FIGURA 5.4a compara a BMA TM e TMH e é nítido que estas são as biomassas que apresentam maior solubilização visível, inclusive a BMA TM mostra-se com as maiores manchas de matéria orgânica do que outras biomassas não hidrolisadas. Logo, esperava-se aumento ou semelhança no rendimento de biometano desta biomassa com a BMA TM.

É difícil apontar uma causa para o baixo rendimento de BMA TMH, uma vez que Salim *et al.* (2018) enfatizam que apesar de eficientes, qualquer tipo de coagulante pode induzir a modificações na composição da biomassa e na produção de metano. Contudo, mesmo que Schneider *et al.* (2018) afirmem que NaOH não deixa resíduos na biomassa, é possível que a hidrólise possa ter desenvolvido inibidores na biomassa e prejudicado a DA.

Ao alterar o pH da biomassa microalgácea pode ocorrer o aumento da disposição de nitrogênio amoniacal no meio e, conseqüentemente, prejudicar a comunidade microbiana responsável pela digestão anaeróbia. O pré-tratamento alcalino, mesmo seguido de correção de pH pode ocasionar no acúmulo de nitrogênio amoniacal na biomassa e desencadear redução tanto na atividade microbiana quanto na produção de biometano (SIALVE *et al.*, 2009).

Zhang *et al.*, (2015) realizaram hidrólise alcalina com NaOH até chegar ao pH 10 e constataram que a solubilização de carboidratos e proteínas aumentaram. Os autores ainda sugeriram que este tipo de pré-tratamento aumenta a degradação de moléculas como celulose, hemicelulose e assim, aumentando a produção de metano. A BMA TM e TMH apresentam as maiores manchas de solubilização (FIGURA 5.4a), porém, BMA TMH não mostrou bom rendimento de biometano.

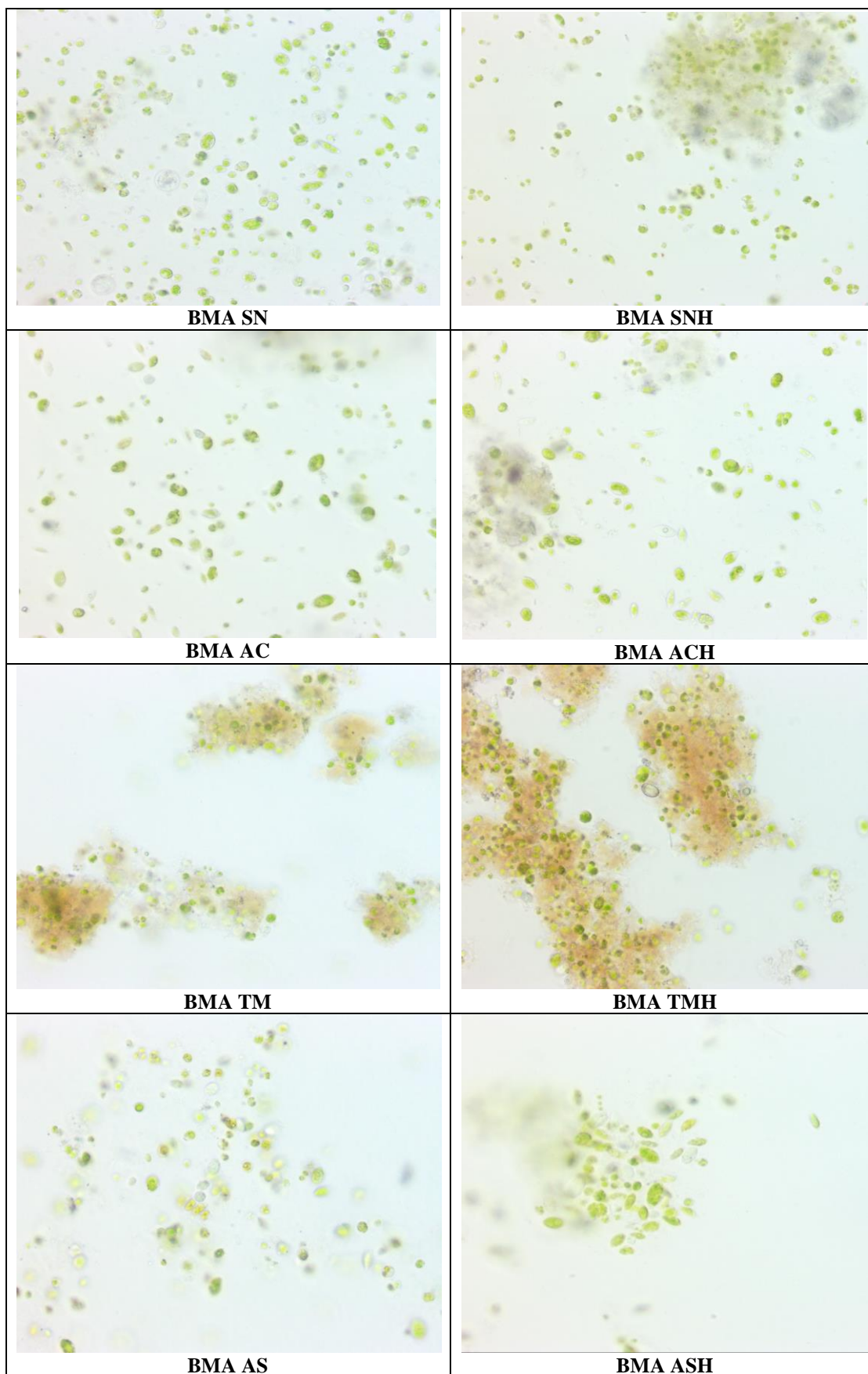
Considerando o incrível aumento de 98,8% no incremento de biometano, a BMA ACH tende a ser uma ótima alternativa para a produção de energia limpa e renovável. O amido é um coagulante barato, eficiente e não tóxico para a biomassa (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015b; UMMALYMA *et al.*, 2017). Mesmo que visivelmente a BMA ACH apresente grande quantidade de células íntegras, a taxa de incremento na produção de biometano comprova que a hidrólise foi suficiente para solubilizar os compostos orgânicos da biomassa e melhorar seu rendimento (FIGURA 5.4a).

Como explica Perazzoli *et al.* (2016), a produção de biometano está relacionada às diferenças específicas da composição celular de cada espécie de microalgas, sendo que, aquelas com maior teor de lipídeos regularmente possuem maior taxa de produção de biometano do que microalgas ricas em proteínas e carboidratos. Contudo, o que se verificou nesta pesquisa é que as biomassas mais ricas em carboidratos e proteínas, tanto antes e após o pré-tratamento, foram as que tiveram maior produção de biometano.

Existe uma correlação positiva entre a taxa de produção de biometano e o grau de solubilização de matéria orgânica (DQO), porém, em alguns casos a produção de metano pode permanecer baixa, indicando que a matéria orgânica está indisponível para a digestão anaeróbia (PASSOS *et al.*, 2013). Neste estudo, através da caracterização das biomassas hidrolisadas e sem hidrólise, percebe-se que mesmo havendo solubilização, a produção de metano caiu, como nos casos das BMA TMH e ASH.

Ao comparar fotomicrografias da BMA AS e ASH é possível notar que em ambos os tratamentos a maioria das células parecem estar íntegras, induzindo que a hidrólise pode não ter sido eficaz na solubilização da matéria orgânica (FIGURA 5.4a). Como Lamberti (2017) realizou a hidrólise durante 4 (quatro) horas e a solubilização máxima foi alcançada no tempo de 2 (duas) horas, a escolha do menor tempo para este estudo pode ter influenciado no desempenho da hidrólise.

A diferença nos resultados de solubilização obtidos por Lamberti (2017) e neste estudo, pode ser atribuída tanto ao tempo de duração do pré-tratamento, assim como na composição microbiológica da biomassa. A autora obteve sua biomassa em uma lagoa aberta de tratamento, onde é possível haver maior diversidade de espécies de microalgas e outros microrganismos, enquanto que nesta pesquisa o cultivo no fotobiorreator fechado limita o crescimento de diversas espécies, tornado a biomassa mais uniforme.



**FIGURA 5.4a.** Biomassa microalgácea coagulada e hidrolisada. Microscópio Opticam O400S, câmera Opticam LOPT14003. Aumento 40X. Diluição 1:5. **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio; **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

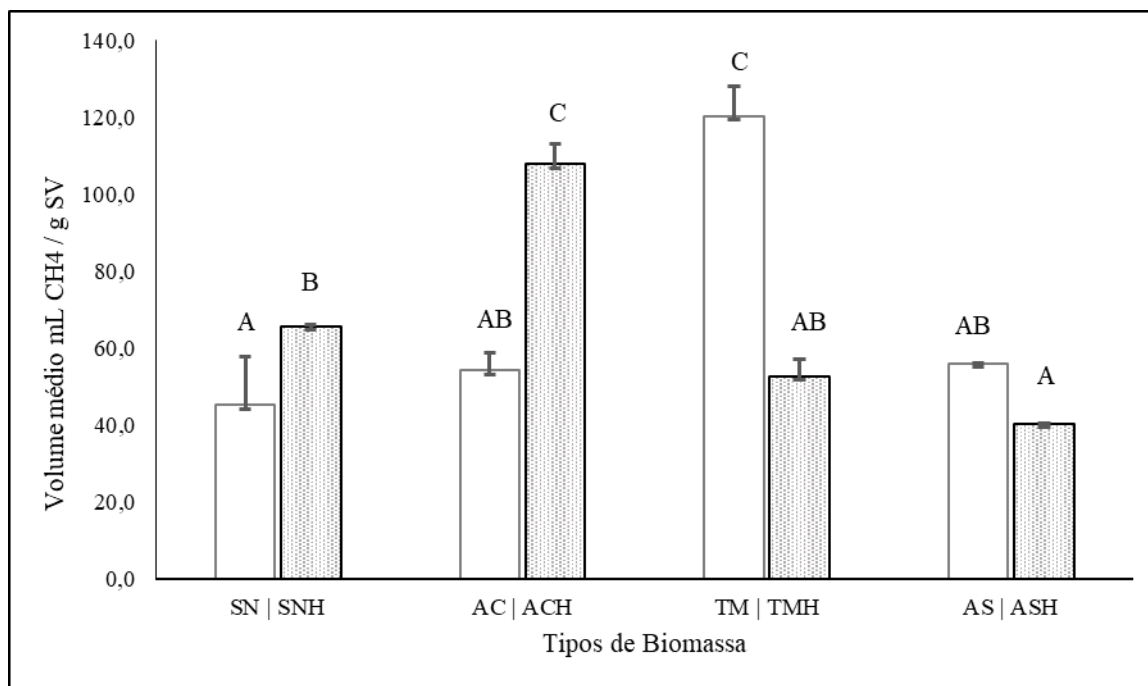
A aplicação de diferentes coagulantes e o pré-tratamento na biomassa coagulada com NaOH revelou diferença significativa na produção de biometano. Nos tratamentos BMA SN x SNH e AC x ACH houve aumento da produção de biometano, enquanto que, após a hidrólise a BMA TMH e ASH apresentaram produção de biometano menor do que a biomassa sem hidrólise (TM e AS) (FIGURA 5.4b).

Considerando os resultados da ANOVA e Teste de Tukey para comparação de tratamentos hidrolisados e não hidrolisados, as amostras se mostraram heterogêneas. Todos os tratamentos com o mesmo coagulante, exceto AS e ASH, são diferentes entre si antes, reforçando a importância da aplicação do pré-tratamento na biomassa. No caso da BMA TMH e ASH a hidrólise promoveu efeito reverso reduzindo a produção de biometano. A toxicidade do sulfato de alumínio é consenso na literatura, contudo, sem a hidrólise a BMA AS rendeu volume similar à BMA AC e SN.

A BMA AS e ASH não apresentam diferença significativa na produção de biometano. O controle negativo hidrolisado (SNH) e ASH mostraram-se diferentes entre si ( $p < 0,01$ ), indicando que o coagulante pode ter sido o fator que interferiu na produção de biometano e na DA, especialmente por ASH ter reduzido o volume de biometano produzido. Contudo, SN e SNH também são diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a hidrólise também pode ser um fator determinante e que interfere na produção de biometano, mesmo que Schneider *et al.* (2018) afirmem que o Hidróxido de Sódio (NaOH – utilizado na hidrólise) não deixa resíduos na biomassa.

Apesar da constatação de Alzate *et al.* (2012) de que a maior concentração de Sólidos Totais também acarreta no maior volume produzido de biometano por um consórcio microbiano em condições anaeróbias, nesta pesquisa, comparando os tratamentos com coagulantes e a hidrólise, o aumento do teor de ST causou a diminuição na produção de biometano (como visto na BMA TM e TMH), enquanto que a diminuição no teor de ST nas biomassas garantiu um aumento progressivo na produção de biometano (TABELA 5.4b).

Este fato corrobora que são vários os fatores que interferem na digestão anaeróbia e na produção de biometano, uma vez que a maior concentração de ST não está correlacionada com a solubilização de compostos orgânicos, especialmente no caso das BMA TM e TMH, em que o aumento da solubilização de carboidratos e lipídeos foi bem mais discreta do que em outros tratamentos, assim como em relação à  $DQO_{total}$  e  $DQO_{solúvel}$  (TABELA 5.1b).



**FIGURA 5.3b.** Variabilidade entre tratamentos com o mesmo coagulante e coagulantes distintos, hidrolisados e sem hidrólise ( $p < 0,01$ ). **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio. **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

**TABELA 5.4b.** Relação de Sólidos Totais dos substratos antes e depois do pré-tratamento.

BIOMASSA	ST (g/L)	BIOMASSA	ST (g/L)	% aumento
SN	50,5	SNH	55,9	10,6
AC	38,0	ACH	34,4	-9,4
TM	22,2	TMH	22,8	2,7
AS	16,2	ASH	12,6	-22,2

Como já foi citado neste trabalho, a hidrólise não necessariamente indica que haverá incremento na produção de metano, apesar de ser utilizada para esta finalidade. Em relação à BMA SN e SNH é nítido que a hidrólise mostrou ser vantajosa e solubilizando maior teor de matéria orgânica para o meio extracelular. O mesmo pode ser inferido ao tratamento BMA ACH, em que houve incremento do biometano de quase 100% em relação a BMA AC.

É possível que a proporção S/I de 0,5 g DQO / g SV do lodo de UASB e da BMA (ALZATE *et al.*, 2012; ESPOSITO *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013) não tenha sido ideal para suprir a atividade do inóculo, fazendo com que houvesse falta de alimento para os microrganismos e, por conseguinte, a produção de biometano apresentou-se reduzida. Os cálculos realizados utilizando esta proporção podem ter fornecido menos matéria orgânica do que o inóculo necessitava para o bom desempenho da digestão anaeróbia.

## 5.5 A ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA

Os resultados da AME revelaram-se correspondentes aos resultados obtidos com a ANOVA e o teste de *Tukey*, com aumento de produção de biometano após a hidrólise nas biomassas SNH e ACH. A única diferença foi em relação à biomassa AS e ASH, como visto na TABELA 5.4a houve redução da produção de biometano após a hidrólise, enquanto que a AME teve sua atividade incrementada depois de passar pelo pré-tratamento alcalino (TABELA 5.5a).

O excesso de nitrogênio amoniacal é um fator que pode influenciar negativamente na AME, principalmente na fase da metanogênese através da inibição por amônia (Yang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018). Após a hidrólise, a BMA ACH mostrou redução de mais de 50% na quantidade de proteínas, enquanto que a BMA TMH revelou um aumento de 3 (três) vezes no teor de proteínas (FIGURA 5.1b), o que poderia ser um dos fatores que ocasionou a queda na produção de biometano desta biomassa quando comparada à biomassa não hidrolisada (BMA TM) e justifica o aumento de ACH em relação a AC.

Por outro lado, Passos *et al.* (2014) dizem que as proteínas, da mesma forma que os lipídeos, podem representar alta contribuição na produção de metano, uma vez que a parede celular das microalgas é rica em glicoproteínas. Tal fator é compatível com o resultado obtido para AME da BMA SNH, em que o teor de proteínas dobrou após a hidrólise e também ocasionou o aumento do volume de biometano produzido (TABELA 5.5a e FIGURA 5.1b). Estes resultados reforçam indícios de que, além do alto teor de proteínas, o coagulante pode ter desencadeado algum efeito inibitório na produção de biometano na BMA TMH.

**TABELA 5.5a.** Atividade metanogênica específica das biomassas sem e com pré-tratamentos.

	AME = $dV / dt$ (gDQO <sub>CH4</sub> / gSSV.d)		% aumento	
<b>SN</b>	2,8	<b>SNH</b>	3,5	25
<b>AC</b>	3,1	<b>ACH</b>	27	771
<b>TM</b>	10	<b>TMH</b>	3,3	-67
<b>AS</b>	4	<b>ASH</b>	6,7	67,5

**LEGENDA:** **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio; **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

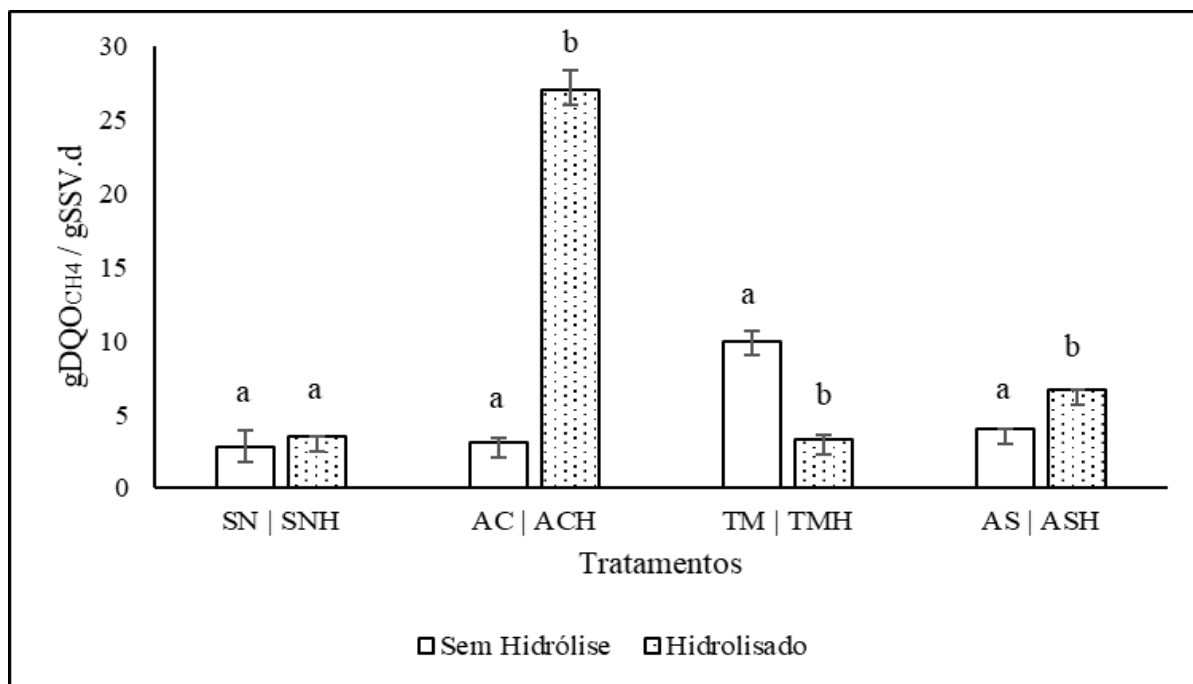
Outro fator que pode causar influência na AME é o pH. Contudo, todos os tratamentos e suas repetições foram colocadas na faixa de pH tendendo à neutralidade, ideal para a digestão anaeróbia (CÓRDOVA *et al.*, 2018). Após o fim dos experimentos todas as repetições passaram por medição de pH, que se mostrou dentro da faixa de atividade da digestão anaeróbia. Por isso, tal variável não foi considerada como um fator que influenciou negativamente na produção de biometano.

A comparação dos tratamentos sem hidrólise e hidrolisados através da ANOVA e teste de *Tukey* mostrou que a AME é similar apenas nos tratamentos SN e SNH. A análise foi realizada comparando apenas tratamentos semelhantes com a biomassa obtida pelo mesmo coagulante, não através de coagulantes diferentes (ex.: SN x SNH, AC x ACH). A AME nos tratamentos AC e ACH, TM e TMH, AS e ASH manifestou diferença significativa de  $p > 0,01$ , enquanto que SN e SNH não possuem diferença significativa (FIGURA 5.5b).

O mais relevante acréscimo na AME foi em relação à BMA AC e ACH, com um incremento de 771% no potencial de produção de biometano. Sun e Cheng (2002) explicam que os carboidratos são fontes importantes de alimento na digestão anaeróbia e estes compostos também tiveram teor bastante aumentado após o pré-tratamento (TABELA 5.5a). A combinação dos nutrientes da biomassa coagulada com amido catiônico de mandioca, o incremento de carboidratos do próprio coagulante e o pré-tratamento pode ser uma influencia no salto que esta biomassa teve na produção de biometano, mostrando-se tão acima das médias dos tratamentos com outros coagulantes (FIGURA 5.5a).

Outro fator que pode modular a atividade metanogênica específica é como acontece a interação entre o inóculo e o substrato. Como a parede das microalgas, especialmente do gênero *Chlorella* sp. são bastante rígidas, o pré-tratamento aplicado pode não ter sido suficientemente eficaz na desintegração da parede celular das microalgas (SILAVE *et al.*, 2009), acarretando na diminuição da produção de biometano, especialmente no caso da BMA TMH.

Por fim, a composição dos compostos orgânicos do substrato influencia diretamente a produção total de biometano e a AME. Enquanto alguns compostos aumentaram seu teor após a hidrólise em determinados tratamentos (SNH, ACH e ASH), o tratamento TMH passou por redução na sua composição de lipídeos e carboidratos, considerados os melhores compostos para incrementar a produção de biometano.



**FIGURA 5.5a.** Comparação da Atividade Metanogênica Específica (AME) entre os diferentes tratamentos sem hidrólise e hidrolisados através da análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey*. **SN** – Biomassa sedimentação natural; **AC** – Biomassa amido catiônico; **TM** – Biomassa tanino modificado; **AS** – Biomassa sulfato de alumínio; **SNH** – Biomassa sedimentação natural hidrolisada; **ACH** – Biomassa amido catiônico hidrolisada; **TMH** – Biomassa tanino modificado hidrolisada; **ASH** – Biomassa sulfato de alumínio hidrolisada.

## 6 CONCLUSÃO

Os tratamentos aplicados à biomassa são viáveis sob diversas perspectivas, como ambiental, financeira e energética. Cada tipo de coagulante apresenta vantagens e desvantagens, assim como o pré-tratamento alcalino. A composição orgânica da biomassa mostrou-se heterogênea. Nas comparações com a biomassa sedimentada naturalmente (controle negativo), a biomassa coagulada com tanino apresentou o melhor rendimento de biometano quando não hidrolisado (120,4 mL CH<sub>4</sub> / g SV), enquanto que os tratamentos com outros coagulantes mostraram-se semelhantes. A biomassa coagulada com tanino modificado pode ser uma alternativa aos coagulantes inorgânicos. O melhor rendimento da biomassa coagulada com tanino sem hidrólise e fotomicrografias indicam que o próprio coagulante já contribui para o rompimento celular, eliminando a etapa de hidrólise, que pode ser cara, com alto gasto energético, contaminante para o meio ambiente e para a biomassa. Apesar de ser o único tratamento estatisticamente diferente sem hidrólise, a biomassa coagulada com tanino aponta que este coagulante atua de forma positiva no aumento do rendimento de biometano. Os já conhecidos problemas ambientais relacionados ao sulfato de alumínio, seus efeitos inibitórios e o fato de ter reduzido o rendimento de biometano após a hidrólise, reforça a diminuição de seu uso na coagulação de microalgas para produção de biometano. Entre os tratamentos hidrolisados, amido catiônico de mandioca revelou-se como mais vantajoso no incremento de biometano, chegando a produzir 107,8 mL CH<sub>4</sub> / g SV. A AME mostrou resultados similares à produção geral de biometano, exceto para a BMA AS e ASH que apresentaram resultados divergentes, em que a AME mostrou maior incremento de metano. Finalmente, a dessemelhança entre todos os tratamentos hidrolisados aponta que tanto o coagulante, assim como a hidrólise, pode interferir na produção de biometano através da digestão anaeróbia.

## **7 RECOMENDAÇÕES**

- Executar ensaios de toxicidade, da composição inorgânica e caracterização físico-química da biomassa após a coagulação, hidrólise, e digestão anaeróbia,
- Caracterizar as soluções de coagulantes,
- Testar outros tipos de pré-tratamentos na biomassa recuperada através dos coagulantes químicos e naturais.

## REFERÊNCIAS

Nº	Título	Qualis Eng. I	Idioma
1	ABBASSI, A.; ALI, M.; WATSON, I. A. Temperature dependency of cell wall destruction of microalgae with liquid nitrogen pretreatment and hydraulic pressing. <b>Algal Research</b> , v. 5, p. 190–194, 2014.	A2	Inglês
2	ALZATE, M. E.; MUÑOZ, R.; ROGALLA, F.; FDZ-POLANCO, F.; PÉREZ-ELVIRA, S. I. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. <b>Bioresource Technology</b> , v. 123, p. 488–494, 2012.	A1	Inglês
3	ANTHONY, R. J.; ELLIS, J. T.; SATHISH, A.; A.; MILLER, C. D.; SIMS, R. C. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. <b>Bioresource Technology</b> , n. 149, p. 65–70, 2013.	A1	Inglês
4	APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. 2005.	-	-
5	AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F.; MONTEGGIA, L. O. Metodologia para determinação da Atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. <b>Eng. Sanit. Ambient.</b> , v. 12, nº. 2, p. 192-201, 2007.	-	-
6	BAHADAR, A.; KHAN, M. B. Progress in energy from microalgae: A review. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 27, p. 128–148, 2013.	A1	Inglês
7	BALI, G.; MENG, X.; DENEFF, J. I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A. J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and acessibility. <b>ChemSunChem</b> , v. 0, p. 1-5, 2014.	-	-
8	BARATHIRAJA, B.; SUDHARSANA, T.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEENKUMAR, R.; CHOZHAVENDHAN, S.; IYYAPPAN, J. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , n. 90, p. 570–582, 2018.	A1	Inglês
9	BEHRENS, P. W. Photobioreactors and Fermentors: the light and dark sides of growing algae. <i>In</i> : ANDERSEN, R. A. <b>Algal culturing techniques</b> . San Diego: Elsevier, 2005, chap 13, 189 – 203.	-	-
10	BELTRÁN-HEREDIA, J. & SÁNCHEZ-MARTÍN, J. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent. <b>Desalination</b> , v. 249, p. 353 – 358, 2009.	A1	Inglês

11	BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and Innovations. <b>International Journal of Chemical Engineering</b> , v. 2013, p. 1–21, 2013.	-	-
12	BIOPROCESS CONTROL SWEDEN AB. AMPTS II & AMPTS II Light. Operation and Maintenance Manual. Version 3.0. Lund, Sweden, 2016, 95 p.	-	-
13	BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. <b>Canadian Journal of Biochemistry and Physiology</b> , v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.	-	-
14	BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 14, n. 2, p. 557-577, 2009.	A1	Inglês
15	CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 19, p. 360–369, 2013.	A1	Inglês
16	CASSINI, S. T. (coord.). Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás. PROSAB, ABES. 210p. Rio de Janeiro, 2003.	-	-
17	CASSINI, S. T. A.; FRANCISCO, S. A.; ANTUNES, P. W. P.; OSS, R. N.; KELLER, R. Harvesting Microalgácea Biomass grown in Anaerobic Effluent from Sewage Treatment by Coagulation-Flocculation: Effect of pH. <b>Brazilian Archives of Biology and Technology (Online)</b> , v. 60, p. 1-12, 2017.	B1	Inglês
18	CASTRILLO, M.; DÍEZ-MONTERO, R.; TEJERO, I. Model-based feasibility assessment of a deep solar photobioreactor for microalgae culturing. <b>Algal Research</b> , n. 29, p. 304 – 318, 2018.	A2	Inglês
19	CAVALCANTI, P. F. F.; HAANDEL, A. VAN; KATO, M. T.; SPERLING, M. VON; LUDUVICE, M. L.; MONTEGGIA, L. O. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lagoas de polimento. <i>In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios</i> . Carlos Augusto Lemos Chemicaró (coord.), Projeto PROSAB, Belo Horizonte [s.n.]. cap. 3, p. 1-51, 2001.	-	-
20	CHEAH, W. Y.; LING, T. C.; SHOW, P. L.; JUAN, J. C.; CHANG, J-S.; LEE, D-J. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. <b>Applied Energy</b> , v. 179, p. 609 – 625, 2016.	A1	Inglês
21	CHEN, P. H.; OSWALD, W. J. Thermochemical Treatment for Algal fermentation. <b>Environment International</b> , v. 24, n. 8, p. 889-897, 1998.	A1	Inglês
22	CHEN, C-Y.; YEH, K-L.; AISYAH, R.; LEE, D-J.; CHANG, J-S.	A1	Inglês

	Cultivation, photobioreactor design and harvesting microalgae for biodiesel production: A critical review. <b>Bioresource Technology</b> , v. 102, p. 71 – 81, 2011.		
23	CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLIC, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , n. 90, p. 336–346, 2018.	A1	Inglês
24	CHERNICARO, C. A. L. <b>Reatores Anaeróbios: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias</b> . Vol. 5; Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 1997.	-	-
25	CHO, S.; PARK, S.; SEON, J.; YU, J.; LEE, T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgácea biomass to enhance anaerobic methane production. <b>Bioresource Technology</b> , v. 143, p. 330–336, 2013.	A1	Inglês
26	CHOY, S. Y.; PRASAD, K. M. N.; WU, T. Y.; RAGHUNANDAN, M. E.; PHANG, S-M.; JUAN, J. C.; RAMANANA, R. N. Separation of Chlorella biomass from culture medium by flocculation with rice starch. <b>Algal Research</b> , vol. 30, p. 162–172, 2018.	A2	Inglês
27	CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S.; TORRES, B. R.; LODI, A.; ZILLI, M. Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. <b>Bioresource Technology</b> , v. 100, p. 5771–5776, 2009.	A1	Inglês
28	CÓRDOVA, O.; SANTIS, J.; RUIZ-FILLIPI, G.; ZUÑIGA, M. E.; FERMOSE, F. G.; CHAMY, R. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , n. 82, p. 2806–2813, 2018.	A1	Inglês
29	DĘBOWSKI, M.; ZIELIŃSKI, M.; GRALA, A; DUDEK, M. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies—Review. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 27, p. 596–604, 2013.	A1	Inglês
30	DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. <b>Ciência Rural</b> , Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.	-	-
31	ELRAYIES, G. M. Microalgae: Prospects for greener future buildings. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , n. 81 p. 1175–1191, 2018.	A1	Inglês
32	ESPOSITO, G.; FRUNZO, L.; LIOTTA, F.; PANICO, A.; PIROZZI, F. Bio-methane potential tests to measure the biogas production from the digestion and co-digestion of complex organic substrates. <b>The Open Environmental Engineering Journal</b> , v. 5, p. 1–8, 2012.	-	-

33	EVERT, R. F.; EICCHORN, S. E. <b>Biology of plants</b> . 8 <sup>th</sup> Edition. New York, NY: W. H. Freeman. 2013. 864p.	-	-
34	FERREIRA, G. H. L. <b>Avaliação do potencial metanogênico da biomassa algácea submetida à hidrólise térmica e hidrólise alcalina</b> . 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em engenharia e desenvolvimento sustentável) – Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.	-	-
35	FRANCISCO, S. A. <b>Recuperação de microalgas cultivadas em efluente de tratamento anaeróbio de esgoto por processo de coagulação-floculação</b> . 2016. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.	-	-
36	GANESHKUMAR, V.; SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; DHARMARAJAN, R.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Use of mixed wastewaters from piggery and winery for nutrient removal and lipid production by <i>Chlorella</i> sp. MM3. <b>Bioresource Technology</b> , n. 256, p. 254–258, 2018.	A1	Inglês
37	GHAIBA, K. & BEN-FARESB, F-Z. Power-to-Methane: A state-of-the-art review. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 8, p. 433–446, 2018.	A1	Inglês
38	GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic digestion of algae. <b>Appl. Microbiol.</b> , v. 5, n. 1, p. 47–55, 1957.	B1	Inglês
39	GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J. Harvesting and processing sewage-grown planktonic algae. <b>J. Water Pollut. Contr. Fed.</b> , v. 37, p. 471 – 498, 1965.	-	-
40	GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., SIALVE, B., BERNET, N., STEYER, J. P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel Part I: focus on cultivation and biofuel production. <b>Biofuels, Bioproducts and Biorefining</b> , v. 6, p. 105-113, 2011a.	A2	Inglês
41	GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., MOLINUEVO-SALCES, B., GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Evaluation of anaerobic codigestion of microalgácea biomass and swine manure via response surface methodology. <b>Appl. Energy</b> , v. 88, p. 3448–3453, 2011b.	A1	Inglês
42	GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., SIALVE, B., BERNET, N., STEYER, J. P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel Part II: focus on biomethane production. <b>Biofuels, Bioproducts and Biorefining</b> , v. 6, p. 205-218, 2011c.	A2	Inglês
43	GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N; STEYER, J. P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of <i>Scenedesmus</i> biomass on methane production. <b>Bioresource Technology</b> , v. 110, p. 610–616, 2012.	A1	Inglês

44	GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, L. M.; CORREA, D. F.; RYAN, S.; JENSEN, P. D.; PRATT, S.; SCHENK, P. M. Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: Towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , n. 82, p. 1137–1148, 2018.	A1	Inglês
45	GUEDES, A. C.; AMARO, H. M; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. <b>Marine Drugs</b> , v. 9, p. 625-664, 2011.	-	-
46	GUPTA, S. K.; KUMAR, N. M.; GULDHE, A.; ANSARI, F. A.; RAWAT, I.; NASR, M.; BUX, F. Wastewater to biofuels: Comprehensive evaluation of various flocculants on biochemical composition and yield of microalgae. <b>Ecological Engineering</b> , n. 117, p. 62–68, 2018.	A1	Inglês
47	GERDE, J. A.; YAO, L.; LIO, J.; WEN, Z.; WANG, T. Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. <b>Algal Research</b> , v. 3, p. 30–35, 2014.	A2	Inglês
48	GUTIÉRREZ, R.; PASSOS, F.; FERRER, I.; UGGETTI, E.; GARCÍA, J. Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production. <b>Algal Research</b> , v. 9, p. 204–211, 2015a.	A2	Inglês
49	GUTIÉRREZ, R.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; UGGETTI, E. Influence of starch on microalgácea biomass recovery, settleability and biogás production. <b>Bioresource Technology</b> , v. 185, p. 341–345, 2015b.	A1	Inglês
50	HAMEED, Y. T.; IDRIS, A.; HUSSAIN, S. A.; ABDULLAH, N. A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to Polyaluminum chloride, and application in a pilot plant. <b>Journal of Environmental Management</b> , v. 184, p. 494 – 503, 2016.	A1	Inglês
51	HE, S.; FAN, X.; LUO, S.; KATUKURI, N. R.; GUO, K. Enhanced the energy outcomes from microalgácea biomass by the novel biopretreatment. <b>Energy Conversion and Management</b> , v. 135, p. 291–296, 2017.	A1	Inglês
52	HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. <b>Bioresource Technology</b> , v. 100, p. 10–18, 2009.	A1	Inglês
53	HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. & LABBÉ. J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. <b>Revista de Biología Marina y Oceanografía</b> , v. 49, n.2, p. 157-173, 2014.	-	-
54	HIMANSHU, H.; VOELKLEIN, M. A.; MURPHY, J. D.; GRANT, J.; O'KIELY, P. Factors controlling headspace pressure in a manual manometric BMP method can be used to produce a methane output comparable to AMPTS. <b>Bioresource Technology</b> , v. 238,	A1	Inglês

	p. 633–642, 2017.		
55	HOU, J.; YANG, Z.; WANG, P.; WANG, C.; YANG, Y.; WANG, X. Changes in Microcystis aeruginosa cell integrity and variation in microcystin-LR and proteins during Tanfloc flocculation and floc storage. <b>Science of the Total Environment</b> , n. 626, p. 264–273, 2018.	A1	Inglês
56	HUSSAIN, A.; DUBEY, S. K. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. <b>Appl. Water Sci.</b> , v. 7, p.: 535–542, 2017.	B2	Inglês
57	IGONI, A. H.; AYOTAMUNO, M. J.; EZE, C. L.; OGAJI, S. O. T.; PROBERT, S. D. Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste. <b>Applied Energy</b> , v. 85, p. 430–438, 2008.	A1	Inglês
58	JAWED, M. & TARE, V. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. <b>Water SA</b> , v. 25, n. 3, p. 345-350, 1999.	A2	Inglês
59	JEBALI, A.; ACIÉN, F. G.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MHIRI, N.; KARRAY, F.; DHOUB, A.; MOLINA-GRIMA, E.; SAYADI, S. Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. <b>Bioresource Technology</b> , n. 198, p. 424–430, 2015.	A1	Inglês
60	KINNUNEN, V.; CRAGGS, R.; RINTALA, J. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating volume reactor. <b>Water research</b> , v. 57, p. 247-257, 2014.	A1	Inglês
61	LAMBERTI, G. G. <b>Solubilização de matéria orgânica e nutrientes do lodo algáceo de uma lagoa de estabilização através de processos hidrolíticos alcalino e térmico</b> . 2017. 122 f. Dissertação (Mestrado em engenharia e desenvolvimento sustentável) – Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.	-	-
62	LEE, R. E. <b>Phycology</b> . 4th Ed. New York: Cambridge University Press, 2008. 561pp.	-	-
63	LETÉLIER-GORDO, C. O.; HOLDT, S. L.; FRANCISCI, L.; KARAKASHEV, D. B.; ANGELIDAKI, I. Effective harvesting of the microalgae Chlorella protothecoides via bioflocculation with cationic starch. <b>Bioresource Technology</b> , v. 167, p. 214–218, 2014.	A1	Inglês
64	LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. <b>Biotechnol. Prog.</b> , v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.	-	-

65	LI, H.; LI, C.; LIU, W.; ZOU, S. Optimized alkaline pretreatment of sludge before anaerobic digestion. <b>Bioresource Technology</b> , v. 123, p. 189–194, 2012.	A1	Inglês
66	LIU, C.; LI, H.; ZHANG, Y.; CHEN, Q. Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. <b>Biochemical Engineering Journal</b> , v. 109, p. 96–100, 2016.	-	-
67	LOGANATHAN, K.; SATHTHASIVAM, J.; SARP, S. Removal of microalgae from seawater using chitosan-alum/ferric chloride dual coagulations. <b>Desalination</b> , n. 433, p. 25 – 32, 2018.	A1	Inglês
68	LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M. D. C. C.; FRANCISCO, G. A. F.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. <b>Bioresource Technology</b> , n. 101, 7587–7591, 2010.	A1	Inglês
69	MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTERO, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Scenedesmus</i> sp. methane production. <b>Energy</b> , v. 78, p. 48-52, 2014.	A1	Inglês
70	MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 14, p. 217–232, 2010.	A1	Inglês
71	MENDEZ, L.; MADHY, A.; TIMMERS, R. A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Enhancing methane production of <i>Chlorella vulgaris</i> via thermochemical pretreatments. <b>Bioresource Technology</b> , v. 149, p. 136 – 141, 2013.	A1	Inglês
72	MILANO, J.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P. K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 58, p. 180–197, 2016.	A1	Inglês
73	MOLINA-GRIMA, E. M.; BELARBI, E. –H.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES-MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgae biomass and metabolites: process options and economics. <b>Biotechnology Advances</b> , v. 20, p. 491–515, 2003.	B1	Inglês
74	MOLINUEVO-SALCES, B.; MAHDY A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. <b>Renewable Energy</b> , v. 96, p. 1103-1110, 2016.	A1	Inglês
75	MUSSGNUG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. <b>Journal of Biotechnology</b> , v. 150, p. 51–56, 2010.	B1	Inglês

76	NASCIMENTO, A. R.; ZIOLLI, R. L.; ARARUN, JR, J. T.; PIRES, C. S.; SILVA, T.B. Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no infravermelho. <b>Eclética Química</b> , vol. 3, n. 1, p. 35 – 42, 2008.	-	-
77	PASSOS, F.; SOLÉ, M.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. <b>Applied Energy</b> , v. 108, p. 168–175, 2013.	A1	Inglês
78	PASSOS, F; UGGETTI, E.; CARRÈRE, H. & FERRER, I. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. <b>Bioresource Technology</b> , v. 172, p. 403–412, 2014.	A1	Inglês
79	PASSOS, F.; FELIX, L.; ROCHA, H.; PEREIRA, J. O.; AQUINO, S. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. <b>Bioresource Technology</b> , v. 209, p. 305–312, 2016	A1	Inglês
80	PATINVOH, R. J.; OSADOLOR, O. A.; CHANDOLIAS, K.; HORVÁTH, I. S.; TAHERZADEH, M. J. Innovative pretreatment strategies for biogas production. <b>Bioresource Technology</b> , v. 224, p. 13–24, 2017.	A1	Inglês
81	PERAZZOLI, S.; BRUCHEZ, B. M.; MICHELON, W.; STEINMETZ, R. L. R.; MEZZARI, M. P.; NUNES, E. O.; SILVA, M. L. B. Optimizing biomethane production from anaerobic degradation of <i>Scenedesmus</i> spp. biomass harvested from algae-based swine digestate treatment. <b>International Biodeterioration &amp; Biodegradation</b> , v. 109, p. 23 – 28, 2016.	A1	Inglês
82	PILLI, S.; BHUNIA, P.; YAN, S.; LEBLANC, R. J.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Ultrasonic pretreatment of sludge: A review. <b>Ultrasonics Sonochemistry</b> , v. 18, p. 1–18, 2011.	B2	Inglês
83	POETSCH, P. B.; KOETZ, P. R. Atividade metanogênica Específica de Lodos Anaeróbicos. <b>Rev. Bras. de Agrociência</b> , v. 4, nº. 3, p. 161-165, 1998.	-	-
84	RAHEEM, A.; PRINSEN, P.; VUPPALADADIYAM, A. K.; ZHAO, M.; LUQUE, R. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. <b>Journal of Cleaner Production</b> , n. 181, p. 42 – 59, 2018.	A1	Inglês
85	RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CARRERAS, N. Use of microalgae residues for biogas production. <b>Chemical Engineering Journal</b> , v. 242, p. 86–95, 2014.	A1	Inglês
86	RAS, M., LARDON, L., SIALVE, B., BERNET, N., STEYER, J. P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of <i>Chlorella vulgaris</i> . <b>Bioresource</b>	A1	Inglês

	<b>Technology</b> , v. 102, n. 1, p. 200–206, 2011.		
87	RIAÑO, B.; MOLINUEVO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. <b>Ecological Engineering</b> , n. 38, p. 110–113, 2012.	A1	Inglês
88	ROCHA, M. A. G. Estudos <b>da atividade metanogênica de lodos e da biodegradabilidade anaeróbia de efluentes de indústrias de bebidas</b> . 2003. 130f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Engenharia Civil Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos), 2003.	-	-
89	SALIM, S.; BOSMA, R.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. <b>Journal of Appl Phycol</b> , n. 23, p. :849 – 855, 2011.	-	-
90	SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-VELASCO, M.; BELTRÁN-HEREDIA, J. Surface water treatment with tannin-based coagulants from Quebracho ( <i>Schinopsis balansae</i> ), <b>Chem. Eng. J.</b> , v. 165, p. 851–858, 2010.	A1	Inglês
91	SANTOS, J. D.; VEIT, M. T.; JUCHEN, P. T.; GONÇALVES, J. C.; PALÁCIO, S. M.; FAGUNDES-KLEN, M. Use of different coagulants for cassava processing wastewater treatment. <b>Journal of Environmental Chemical Engineering</b> , v. 6, p. 1821–1827, 2018.	B1	Inglês
92	SARATALE, R. G.; KUMAR, G.; BANU, R.; XIA, A.; PERIYASAMY, S.; SARATALE, G. D. A Critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. <b>Bioresource Technology</b> , vol. 262, p. 319–332, 2018.	A1	Inglês
93	SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. <b>Bioenerg. Res.</b> , v. 1, p. 20–43, 2008.	B1	Inglês
94	SCHNEIDER, R. C. S.; LIMA, M. M.; HOELTZ, M.; NEVES, F. F.; JOHN, D. K.; AZEVEDO, A. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture media. <b>Algal Research</b> , vol. 32, p. 280–292, 2018.	A2	Inglês
95	SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgácea biodiesel sustainable. <b>Biotechnology Advances</b> , v. 27, p. 409–416, 2009.	-	-
96	SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. <b>Journal of Environmental Management</b> , n. 217, p. 499 – 508, 2018.	A1	Inglês

97	SRINUANPAN, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTSAN, P. Effective biogas upgrading and production of biodiesel feedstocks by strategic cultivation of oleaginous microalgae. <b>Energy</b> , n. 148, p. 766 – 774, 2018.	A1	Inglês
98	SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. <b>Bioresource Technology</b> , v. 83, p. 1-11, 2002.	A1	Inglês
99	TAN, X. B.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; WONG, C. Y.; LEE, K. T. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. <b>Chinese Journal of Chemical Engineering</b> , n. 26, p. 17–30, 2018.	-	-
100	TOMASELLI, L. The microalgácea cell. <i>In</i> : Richmond, A. (Ed.). <b>Handbook of Microalgácea Culture: Biotechnology and Applied Phycology</b> . Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 03-19.	-	-
101	TORK, M. B.; KHALILZADEH, R.; KOUCHAKZADEH, H. Efficient harvesting of marine <i>Chlorella vulgaris</i> microalgae utilizing cationic starch nanoparticles by response surface methodology. <b>Bioresource Technology</b> , n. 243, p. 583–588, 2017.	A1	Inglês
102	UMMALYMA, S. B.; GNANSOUNOU, E.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; A.; SAHOO, D. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. <b>Bioresource Technology</b> , 242, p. 227–235, 2017.	A1	Inglês
103	VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MEESCHAERT, B.; MUYLAERT, K. Flocculation of microalgae using cationic starch. <b>J Appl Phycol.</b> , n. 22, p.525–530, 2010	-	-
104	YAN, Q.; ZHAO, M.; MIAO, H.; RUAN, W.; SONG, R. Coupling of the hydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) production through anaerobic digestion from Taihu blue algae. <b>Bioresource Technology</b> , v. 101, p. 4508–4512, 2010.	A1	Inglês
105	YANG, Z.; GUO, R.; XU, X.; FAN, X.; LI, X. Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgácea biomass residues through pretreatment. <b>International Journal of Hydrogen Energy</b> , 35, p. 9618-9623, 2010.	A1	Inglês
106	YANG, Z.; GUO, R.; XU, X.; FAN, X.; LUO, S. Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgácea biomass residues. <b>International Journal of Hydrogen Energy</b> , v. 36, p. 3465-3470, 2011.	A1	Inglês
107	ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. <b>Bioresource Technology</b> , v. 102, p. 1149–1158, 2011.	A1	Inglês

108	ZHAO, J. M.; MA, C. Y.; LIU, L. H. Temporal scaling of the growth dependent of optical properties of microalgae. <b>Journal of Quantitative Spectroscopy &amp; Radiative Transfer</b> , n. 214, p. 61 – 70, 2018.	-	-
109	ZHANG. S.; GUO H.; DU L.; LIANG J.; LU X.; NAN LI N.; ZHANG K. Influence of NaOH and thermal pretreatment on dewatered activated sludge solubilisation and subsequent anaerobic digestion: Focused on high-solid state. <b>Bioresource Technology</b> , v. 185, p. 171–177, 2015.	A1	Inglês
110	Zhen, G.; Lu, X.; Kato, H.; Zhao, Y.; Li, Y-Y. Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full scale application and future perspectives. <b>Renewable and Sustainable Energy Reviews</b> , v. 69, p. 559–577, 2017.	A1	Inglês
<b>1 = TOTAL PERIÓDICOS CLASSIFICADOS WEB QUALIS (A1, A2, B1 E B2)</b>			<b>79</b>
<b>2 = TOTAL PERIÓDICOS CLASSIFICADOS WEB QUALIS EM INGLÊS</b>			<b>79</b>
<b>3 = RELAÇÃO % ENTRE PERIÓDICOS WEBQUALIS E PUBLICADOS INGLÊS</b>			<b>100</b>