UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

NATHALIA OLIVEIRA DOS SANTOS

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA DA MICROALGA *ISOCHRYSIS GALBANA*

RIO DE JANEIRO

2013

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA DA MICROALGA *ISOCHRYSIS GALBANA*

NATHALIA OLIVEIRA DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Magali Christe Cammarota, D Sc
Larissa de Carvalho Alves, Ph D

Rio de Janeiro - RJ

Agosto de 2013

Santos, Nathalia Oliveira.

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA DA MICROALGA *ISOCHRYSIS GALBANA* / Nathalia Oliveira dos Santos – Rio de Janeiro, 2013. UFRJ/Escola de Química 2013 – 129f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadores: Magali Christe Cammarota / Larissa de Carvalho Alves

– Teses. M. Christe Cammarota, I. (Orient.). II.

Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA DA MICROALGA *ISOCHRYSIS GALBANA*

NATHALIA OLIVEIRA DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.).

Rio de Janeiro, de Agosto de 2013.

_____

Profª Magali Christe Cammarota, D.Sc. – EQ/UFRJ (Orientadora)

_____

Profª Larissa de Carvalho Alves, D.Sc. – Universidade Estácio de Sá (Orientadora)

_____

Profª Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph.D. – EQ/UFRJ

_____

Profª Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc. – Polo de Xerem/UFRJ

_____

Prof. Ricardo Moreira Chaloub, D.Sc. – IQ/UFRJ

Dedico esta Dissertação a Deus, aos meus pais que proporcionaram a educação necessária para obtenção desta conquista, por todo carinho e dedicação, ao meu noivo Luciano, por todo amor, incentivo, compreensão e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida, forças para continuar e por colocar pessoas tão especiais na minha vida;

Ao meu pai Robson por todo carinho, apoio e incentivo, por sempre me lembrar de que qualificação é um investimento a longo prazo, mas que sempre compensa e por estalar minhas costas para aliviar a tensão;

A minha mãe Neli pelo apoio, dedicação, carinho e massagem nos pés nas inúmeras crises de enxaqueca;

Ao Lucky, meu cachorro hiperativo e querido, por encher a minha casa e a vida de todos de alegria e diversão.

A minha orientadora Magali Christe Cammarota por sua disponibilidade, por responder e-mail rápido, pela paciência e por não desistir de acreditar;

A minha orientadora Larissa de Carvalho Alves por estar sempre disponível apesar da distância, pela paciência, atenção e dedicação.

A técnica Suzana por todo o apoio, dedicação, carinho, por me acalmar nos momentos de desespero, pelas risadas, por todas as dicas, mas principalmente pela amizade.

As queridas Larissa Silva, Jaqueline Greco, Luciene Siliprandi e Monique Santos por todo carinho, incentivo, momentos divertidos e pela amizade.

A Dona Edinéia, pelo carinho, pelos conselhos, preocupação, pelas ótimas receitas de chá e amizade.

Ao Laboratório de Tecnologia Ambiental de forma geral, por ter me proporcionado um ambiente de crescimento pessoal e profissional.

As minhas irmãs escolhidas pela vida, Verônica e Juliana e ao meu irmão do coração, Joseph, pela paciência, carinho, apoio incondicional, pelas horas ao telefone e pela amizade sincera e eterna.

A professora Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo e ao laboratório H2CIN pela colaboração e disponibilidade.

Ao meu noivo Luciano, por toda a paciência e dedicação, por me ajudar tanto, me aguentar até mesmo nos momentos em que nem eu conseguia, mas principalmente por me amar e me fazer tão feliz.

Obrigada a todos que me desejaram bem, confiaram e acreditaram em mim, pois o apoio de vocês foi fundamental para esta conquista.

Agradeço também aos que por descuido esqueci-me de mencionar.

RESUMO

SANTOS, Nathalia Oliveira. Produção de biogás a partir de biomassa da microalga *Isochrysis galbana*. Orientadoras: Magali Christe Cammarota, D. Sc. / Larissa de Carvalho Alves, Ph D. Rio de Janeiro: ESCOLA DE QUÍMICA / UFRJ, 2013.

A biodegradabilidade anaeróbia de biomassa residual da microalga *Isochrysis galbana* do processo de sequestro de carbono realizado em fotobiorreatores, antes e após etapas preliminares de hidrólise térmica e química, foi avaliada com base na produção de metano. Foram realizados planejamentos experimentais para avaliação das melhores condições de hidrólise ácida e alcalina, combinando-se as variáveis percentual de ácido ou base, temperatura e concentração de DQO particulada, e empregando-se o aumento da DQO solúvel como variável resposta. Existe um tempo ótimo de reação, assim como uma relação ácido:DQO particulada e temperatura:DQO particulada ideal. Adotou-se um pré-tratamento mecânico para melhor disponibilizar a matéria orgânica e minimizar os percentuais de ácido adicionados na reação. O pré-tratamento mecânico favoreceu a disponibilidade de nutrientes e o uso de condições reacionais mais brandas. A hidrólise alcalina mostrou-se ineficaz em comparação à hidrólise ácida. Avaliou-se a remoção de DQO solúvel e a produção de biogás e metano em ensaios de biodegradabilidade anaeróbia conduzidos com biomassa *in natura* e após hidrólise ácida. Experimentos de biodegradação foram conduzidos com biomassa não lavada e ajuste de pH com $NaHCO_3$ e com biomassa lavada e ajuste de pH com $Ca(OH)_2$ para avaliar o efeito inibitório do Na^+ no processo de digestão anaeróbia. A melhor condição de hidrólise com base na produção de metano foi 40°C, com adição de 0,2% (v/v) de ácido, por 16 h, produzindo 16,4 mL de metano. Esta condição apresenta boa relação custo benefício, pois requer baixa temperatura e adição de reagentes. A análise de carboidratos e proteínas nas frações solúveis de amostras Controle e hidrolisadas revelou a presença majoritária de carboidratos em comparação a quantidade de proteínas. Este fato justificou uma maior produção de metano nas condições com maior concentração de carboidratos. Amostras de biomassa lavada apresentaram um maior percentual e volume de metano (86,5%, 13 mL), se comparadas à amostras de biomassa não lavada (30%, 5 mL). Observou-se uma diferença de 55 vezes na concentração de sódio entre as amostras de biomassa lavada e não lavada, podendo este resultado justificar o baixo rendimento de metano nas amostras não lavadas. Os resultados obtidos permitem concluir que a inclusão da digestão anaeróbia da biomassa da

microalga marinha *Isochrysis galbana* na análise do ciclo de vida do processo de captura de CO_2 e produção de biodiesel precisa ser melhor avaliada.

Palavras-chave: Biomassa de microalga, Pré-tratamento, Digestão anaeróbia, Produção de biogás, *Isochrysis galbana*.

ABSTRACT

SANTOS, Nathalia Oliveira. Biogas Production From Biomass of Microalgae *Isochrysis galbana*. Advisors: Magali Christe Cammarota, D. Sc. / Larissa de Carvalho Alves, PhD. Rio de Janeiro: ESCOLA DE QUÍMICA / UFRJ, 2013.

The anaerobic biodegradability of residual biomass of microalgae in the process of carbon sequestration performed in a pilot plant before and after the preliminary stages of thermal and chemical hydrolysis was evaluated based on the production of methane. Experimental designs were conducted to evaluate the best conditions for acid and alkaline hydrolysis combining the variables percentage of acid or base, temperature and concentration of particulate COD and using soluble COD increase as the response variable. There is an optimum reaction time and ideal ratios acid: particulate COD and temperature: COD particulate ideal. It was applied a mechanical pre-treatment to increase availability of organic matter and minimize the percentage of acid added in the reaction. The mechanical pre-treatment improved the availability of nutrients and allowed the use of milder reaction conditions. Alkaline hydrolysis was ineffective compared to acid hydrolysis. Removal of soluble COD and the production of biogas and methane were evaluated in anaerobic biodegradability tests conducted with biomass *in natura* and after acid hydrolysis. Biodegradation experiments were conducted with unwashed biomass and pH adjustment with $NaHCO_3$ and washed biomass and adjusting pH with $Ca(OH)_2$, to evaluate the inhibitory effect of Na^+ on the anaerobic digestion process. The optimum condition of hydrolysis to the production of methane was 40 ° C, with addition of 0.2% (v/v) acid for 16 h, producing 16.4 mL of methane. This condition is cost-effective because it requires low temperature and addition of reagents. The analysis of carbohydrates and proteins in the soluble fractions of control and hydrolyzed samples revealed the predominant presence of carbohydrates compared to protein. This fact supported a higher methane production in conditions with a higher concentration of carbohydrates. Washed biomass samples showed a greater volume and percentage methane (86.5%, 13 ml) compared to unwashed biomass samples (30%, 5.4 mL). There was a difference of 55 times between sodium concentration in the biomass samples washed and unwashed, this result may explain the low yields of methane in samples not washed. Results indicate that the inclusion of anaerobic digestion of biomass of marine microalga *Isochrysis galbana* in analyzing the life cycle of the process for CO_2 capture and production of biodiesel needs to be better evaluated.

Keywords: Microalgae Biomass, pre-treatment, anaerobic digestion, biogas production, *Isochrysis galbana*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 18

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1 Microalgas 21
2.1.1 Haptophytas 22
2.1.2 Cultivo de microalgas 25
2.1.3 Sequestro de carbono 28
2.1.4. Potencial para biocombustível 29
2.2. Digestão Anaeróbia de Biomassa de Algas 33
2.2.1. Etapas da digestão anaeróbia 35
2.2.2. Fatores de influência na digestão anaeróbia 37
2.2.3. Produção de metano a partir da digestão anaeróbia de microalgas 40

3. MATERIAIS E MÉTODOS 54
3.1 Biomassa de Microalga 54
3.1.1 Meio de cultivo 54
3.1.2 Condições de cultivo 55
3.2 Lodo anaeróbio 56
3.3 Pré-tratamento com agitação mecânica 56
3.4 Hidrólise térmica e ácida da biomassa de algas 57
3.4.1 Efeito da temperatura, pressão e concentração de ácido 57
3.4.2 Efeito da concentração inicial de biomassa 58
3.5 Hidrólise térmica e alcalina da biomassa de algas 59
3.6 Planejamento experimental 59
3.6.1 Planejamento experimental – Hidrólise ácida 60
3.6.2 Planejamento experimental – Hidrólise alcalina 60
3.7 Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia 61
3.8 Métodos analíticos 62
3.8.1 Caracterização da biomassa e lodo, monitoramento dos ensaios 62
3.8.2 Determinação da composição do biogás 63
3.8.3 Determinação de carboidratos 63
3.8.4 Determinação de proteínas 64

3.8.5 Determinação de cloretos 64

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
4.1. Caracterização da suspensão de biomassa de microalgas 65
4.2. Pré-tratamento com agitação mecânica 67
4.3. Hidrólise térmica e ácida da biomassa de algas 67
4.3.1 Efeito da temperatura, pressão e concentração de ácido 67
4.3.2 Efeito da concentração inicial de biomassa 69
5.5 Planejamento experimental – Hidrólise ácida 74
4.6 Planejamento experimental – Hidrólise alcalina 81
4.7 Ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia com Biomassa após Hidrólise ácida 86
5.8 Influência da composição dos hidrolisados sobre a biodegradabilidade anaeróbia 92
4.9 Efeito da salinidade na produção de metano 93

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 97

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES 98

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

8. ANEXOS 114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fluxograma das aplicações potenciais das microalgas (Fonte: adaptado de Costa e Morais, 2011). 22
Figura 2.2 – Classificação taxonômica da microalga *Isochrysis galbana* 24
Figura 2.3 – Foto dimensionada da microalga *Isochrysis galbana*. (Fonte: MACHADO, 2011). 25
Figura 2.4 – Tanques elípticos para o cultivo de *Arthospira platensis* na Fazenda New Ambadi, Índia (Fonte: Lourenço, 2006). 26
Figura 2.5 – Fotobiorreator tubular com capacidade de 1000L na Universidade de 27
Figura 2.6 – Biociclo da digestão. Fonte: Muniz (2002). 34
Figura 2.7 – Etapas da digestão anaeróbia. (Fonte: adaptado de Chernicharo, 2007) 35
Figura 2.8 – Diagrama de dissociação (α) x pH para as espécies do sistema carbonato. Fonte: Xavier (2012); Shriver (2008). 40
Figura 2.9 – Composição aproximada de microalgas (Fonte: adaptado de Tokusoglu e Ünal, 2003). 42
Figura 2.10 – Rendimentos de métodos de conversão de energia diferenciados, com e sem pré-tratamento (adaptado de Lakaniemi et al., 2013). 51
Figura 3.1 – Esquema de hidrólise da biomassa de microalgas 58
Figura 3.2 – Frascos tipo penicilina em ensaio de biodegradabilidade anaeróbia. 61
Figura 4.1 – Percentual de solubilização da DQO particulada inicial de 2944 mg/L sob diferentes condições. 72
Figura 4.2 – Percentual de solubilização da DQO particulada inicial de 1697 mg/L sob diferentes condições. 73
Figura 4.3 – Percentual de solubilização da DQO particulada inicial de 4454 mg/L sob diferentes condições. 73
Figura 4.4 – Diagrama de Pareto com resultados do planejamento A. 75
Figura 4.5 – Gráficos de superfície para interações Ácido x DQOp, Temperatura x DQOp e Temperatura x Ácido no planejamento A. 77
Figura 4.6 – Diagrama de Pareto do planejamento B. 78
Figura 4.7 – Gráficos de superfície para interações Ácido x DQOp, Temperatura x DQOp e Temperatura x Ácido no planejamento B. 80
Figura 4.8 – Diagrama de Pareto para os resultados do planejamento C. 82

Figura 4.9 – Gráficos de superfície para interações Base x DQOp, Temperatura x DQOp e Temperatura x Base no planejamento C. 83
Figura 4.10 – Diagrama de Pareto com resultados do planejamento D. 85
Figura 4.11 – Volume de biogás (30ºC) produzido ao longo do tempo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia no primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) contatos, nas condições Controle (biomassa sem hidrólise) e com biomassas hidrolisadas a 150ºC/0,5% ácido (Condição C1), 100ºC/1% ácido (condição C2) e 100ºC/0,5% ácido (condição C3). ... 87
Figura 4.12 – Volume de biogás (30ºC) produzido ao longo do tempo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia nas condições Controle 1 (sem pré-tratamento mecânico), Controle 2 (com pré-tratamento mecânico) e com biomassas hidrolisadas nas condições 3 (40ºC/0,2%/16 h), 4 (60ºC/16 h) e 5 (40ºC/16 h). 91
Figura 4.13 – Avaliação da produção de biogás ao longo do tempo 94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Pesquisas realizadas com microalgas. 23
Tabela 2.2 – Comparação entre fotobiorreator e lagoa (Fonte: Chisti, 2007). 27
Tabela 2.3 – Fontes de produção de biodiesel. Fonte: Mata et al. (2010). 30
Tabela 2.4 – Comparação de fontes de biodiesel, considerando o atendimento a 50% do combustível utilizado pela frota dos EUA. Fonte: Adaptado de Chisti (2007) 31
Tabela 2.5 – Teor de lipídios e produtividade de diferentes espécies de microalgas. Fonte: Mata et al. (2010). 32
Tabela 2.6 – Especificidade de degradação de substratos a cada faixa de pH (Fonte: Chernicharo, 2007). 37
Tabela 2.7 – Efeitos da amônia livre sobre os processos anaeróbios (Fonte: Chernicharo, 2007). 38
Tabela 2.8 – Rendimento de metano. Fonte: SIALVE et al. (2009) 42
Tabela 2.9 – Composição aproximada de microalgas baseada em porcentagem de peso seco. Fonte: adaptado de Tokusoglu e Ünal (2003) 42
Tabela 2.10 – Elementos minerais (mg/ 100 g de peso seco) na composição de microalgas (Fonte: adaptado de Tokusoglu e Ünal, 2003). 44
Tabela 2.11 – Concentrações estimuladoras e inibidoras de alguns cátions (Fonte: Chernicharo, 2007). 45
Tabela 2.12 – Rendimento de metano e amônia por espécie. Fonte: (Sialve et al., 2009) 48
Tabela 2.13 – Produção de hidrogênio a partir de várias espécies de microalgas. (Fonte: adaptado de Lakaniemi et al., 2013). 52
Tabela 2.14 – Produção de metano a partir de várias espécies de microalgas (Fonte: adaptado de Lakaniemi et al. (2013). 52
Tabela 3.1 – Concentração das soluções adicionadas à água salina para preparo do meio f/2 (GUILLARD, 1975; PICARDO, 2012). 55
Tabela 3.2 – Ensaio de pré-tratamento mecânico. 57
Tabela 3.3 – Valores de DQO nos ensaios de hidrólise. 58
Tabela 3.4 – Interpretações para os valores p obtidos nos testes de hipóteses (Fonte: CALADO e MONTGOMERY, 2003). 59
Tabela 3.5 – Níveis das variáveis independentes do planejamento A (2 h). 60

Tabela 3.6 – Níveis das variáveis independentes do planejamento B (amostra pré-tratada, 16 h). 60
Tabela 3.7 – Níveis das variáveis independentes do planejamento C (2h) 60
Tabela 3.8 – Níveis das variáveis independentes do planejamento D (amostra pré-tratada, 16 h). 61
Tabela 3.9 – Solução de Macro e Micronutrientes (Fonte: CHERNICHARO, 2007). 62
Tabela 3.10 – Metodologia de análises (Fonte: APHA, 2005). 63
Tabela 4.1 – Caracterização da suspensão de biomassa da microalga *Isochrysis galbana*. 65
Tabela 4.2 – Solubilização de DQO no pré-tratamento com pérolas de vidro. 67
Tabela 4.3 – Resultados da hidrólise para DQO particulada inicial de 2944 mg/L (DQO solúvel inicial de 620 mg/L) sob diferentes concentrações de ácido, pressão, temperatura e tempo. 68
Tabela 4.4 – Resultados da hidrólise para DQO particulada inicial de 1697 mg/L (DQO solúvel inicial de 208 mg/L) sob diferentes concentrações de ácido, temperatura, pressão e tempo. 70
Tabela 4.5 – Resultados da hidrólise para DQO particulada inicial de 4454 mg/L (DQO solúvel inicial de 327 mg/L) para diferentes concentrações de ácido, temperatura, pressão e tempo. 71
Tabela 4.6 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento A. 75
Tabela 4.7 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento B. 78
Tabela 4.8 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento C. 81
Tabela 4.9 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento D. 84
Tabela 4.10 – Condições selecionadas para ensaios de biodegradabilidade anaeróbia de acordo com o planejamento experimental A. 86
Tabela 4.11 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia: volume e composição de biogás nas condições Controle (biomassa sem hidrólise) e com biomassas hidrolisadas a 150ºC/0,5% ácido (Condição 1), 100ºC/1% ácido (condição 2) e 100ºC/0,5% ácido (condição 3). 89
Tabela 4.12 – Condições selecionadas para ensaios de biodegradabilidade anaeróbia de acordo com o planejamento experimental B. 90
Tabela 4.13 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia: volume e composição de biogás nas condições Controle 1 (sem pré-tratamento mecânico), Controle 2 (com pré-tratamento mecânico) e com biomassas hidrolisadas nas condições 3 (40ºC/0,2%/16 h), 4 (60ºC/16 h) e 5 (40ºC/16 h). 92

Tabela 4.14 – Valores de concentração de carboidrato e proteína para os planejamentos realizados. 92
Tabela 4.15 – Avaliação da produção de metano e dióxido de carbono com biomassa com e sem pré-lavagem, submetida à condição de hidrólise 40ºC/0,2% ácido/16 h. 94
Tabela 4.16 – Concentração de cloreto e sódio nas amostras de biomassa. 95

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A produção e o consumo de biocombustíveis líquidos vêm aumentando dia a dia, mas o atendimento às demandas globais de energia do setor de transportes continuará limitado devido a: concorrência com terras aráveis para a produção de alimentos e fibras, necessidade de uso de fertilizantes, falta de gerenciamento de boas práticas agrícolas nas economias emergentes, conservação da biodiversidade e estruturas de mercados regionalmente limitados (SINGH et al., 2011).

Na tentativa de se produzir uma energia sustentável e impactar menos o meio ambiente foram desenvolvidos combustíveis oriundos de diversas fontes, como culturas alimentares (conhecidos como de primeira geração) e matérias primas não alimentares como o pinhão e resíduos de óleo biodiesel, tidos como biocombustíveis de segunda geração. No entanto, os biocombustíveis de primeira e segunda geração não foram capazes de suprir a crescente demanda do setor de transporte (SCOTT et al., 2010.).

Recentemente, diversas pesquisas têm investigado o potencial das microalgas para a captura e sequestro de CO_2 e geração de biocombustíveis. Dentre os produtos gerados no cultivo de microalgas com absorção de CO_2, o biodiesel é hoje o que gera mais interesse. Muitas espécies de microalgas já são conhecidas como acumuladoras de óleo, que pode ser extraído e utilizado para a produção de biodiesel, permitindo a geração de um biocombustível de terceira geração com impacto ambiental bem reduzido (SCOTT et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2013). Dentre as diversas espécies utilizadas para a produção de biodiesel, pode-se citar *Pyrrosia laevis, Dunaliella sp, Chlorella vulgaris, Neochloris oleoabundans* e *Isochrysis galbana*, sendo a última a fonte dos nossos estudos (DENG et al., 2009).

Biocombustíveis obtidos a parir de plantas podem ser usados diretamente nos motores atuais, fato que os torna mais atraentes do que a energia eólica e das marés, além do fato da atual preocupação com a redução das reservas de petróleo mundiais (SCOTT et al., 2010).

A produção de biodiesel gera uma biomassa de algas residual que deve ser gerenciada, para evitar que seu lançamento em corpos hídricos ocasione a contaminação destes corpos, assim como a exacerbação de fenômenos de eutrofização. O descarte da biomassa de algas, seja após a etapa de extração de lipídios ou de qualquer outro procedimento, aumenta a demanda de oxigênio e libera substâncias orgânicas oriundas do metabolismo dos micro-organismos em corpos hídricos. Assim, forma-se um ambiente anaeróbio que propicia a atividade de bactérias, que liberam gases de odor fétido. Pode ocorrer também o acúmulo de nutrientes (compostos de nitrogênio e fósforo) que aumentam a taxa de crescimento e morte

de algas, reduzindo a vida útil de lagos e lagoas, em um fenômeno denominado eutrofização (SIALVE et al., 2009).

Neste cenário, o tratamento anaeróbio surge como uma tecnologia promissora para a gestão desse resíduo, visando um tratamento e disposição final adequados e ao mesmo tempo a obtenção de energia na forma de metano, o que pode contribuir para a sustentabilidade da produção de biodiesel a partir de microalgas.

A digestão anaeróbia propicia a formação de um biogás que contém CH_4, um produto de grande interesse comercial devido ao seu uso como combustível. Este tipo de digestão consiste no processamento biológico da fração orgânica da amostra em questão. Assim, a biomassa de algas favorece a digestão anaeróbia, no sentido de prover um grande aporte de matéria orgânica. Além disso, a digestão anaeróbia apresenta-se como um processo menos oneroso, uma vez que não necessita de etapas de secagem, é de simples operação e menor geração de resíduos (CHERNICHARO, 2007; SIALVE et al., 2009).

Entretanto, algumas algas apresentam um revestimento de celulose ou mucilagem, que torna necessária uma etapa de pré-tratamento da amostra, visando romper esta barreira que compromete o acesso dos micro-organismos à matéria orgânica. Assim, no intuito de tornar mais acessível a matéria orgânica solubilizada, aumentando consequentemente a produção de biogás, diferentes métodos de pré-tratamento são estudados, como por exemplo, o pré-tratamento mecânico, térmico, químico, enzimático ou até mesmo a combinação destes (HABIG, 1985).

De forma geral, o tratamento mecânico pode ser uma alternativa satisfatória, pois apresenta menor custo com reagentes e menor alteração nas características da amostra. Um pré-tratamento químico bem difundido é a hidrólise, que pode ser ácida, alcalina ou enzimática. Em todos esses métodos, o objetivo é romper a estrutura que atua como barreira ao acesso do material a ser degradado e aumentar a área superficial do material (HABIG, 1985).

Sabe-se que a hidrólise química é mais rápida e menos onerosa se comparada à hidrólise enzimática, assim, a hidrólise ácida e alcalina são mais vantajosas do ponto de vista econômico. Para a escolha de um reagente ácido ou alcalino deve-se realizar uma análise da composição da amostra, uma vez que é bem descrito na literatura uma maior eficiência da hidrólise ácida em meios ricos em carboidratos e uma melhor eficiência da hidrólise alcalina em meios ricos em proteínas (HARUN et al., 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção de metano a partir de biomassa de microalgas oriunda de um processo de sequestro de carbono, utilizando o

processo de digestão anaeróbia da biomassa após pré-tratamentos por hidrólise térmica, alcalina ou ácida.

Os objetivos específicos foram:

- Obter uma caracterização físico-química da suspensão de biomassa de microalgas;
- Obter a melhor condição de pré-tratamento (hidrólise térmica, ácida ou alcalina) da biomassa em termos de solubilização de matéria orgânica (avaliada como DQO solúvel);
- Obter a melhor condição de tratamento da biomassa em termos de produção de metano.

Para cumprir tais objetivos, as seguintes etapas de trabalho foram delineadas:

- Coleta, concentração e caracterização da suspensão de microalgas em termos de pH, Sólidos, DQO, DBO_5, Carbono, Nitrogênio, Fósforo, Óleos e Graxas, Carboidratos e Proteínas;
- Avaliação de um pré-tratamento mecânico (agitação com pérolas de vidro) da biomassa de microalgas com diferentes massas de pérolas de vidro e tempo de agitação sobre a solubilização de DQO;
- Avaliação da solubilização de DQO por hidrólise térmica e ácida da biomassa de microalgas sob diferentes condições de pressão, temperatura, tempo, concentração de ácido e de biomassa (avaliada como DQO particulada);
- Realização de planejamento experimental para investigar que fatores (temperatura, concentração de ácido e biomassa) e interações seriam mais significativos na solubilização de DQO por hidrólise térmica e ácida de biomassa de microalgas por 2 e 16h;
- Condução de ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com biomassa após hidrólise ácida, sob diferentes temperaturas e concentrações de ácido, avaliando-se a eficiência de remoção de DQO e volume e composição do biogás em bateladas sequenciais;
- Avaliação da relação entre a composição dos hidrolisados e a biodegradabilidade anaeróbia;
- Avaliação do efeito da salinidade residual da suspensão de biomassa de microalgas na digestão anaeróbia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas

Microalgas é um termo utilizado para designar micro-organismos microscópicos, constituintes do fitoplâncton, que surgiram há mais de três milhões de anos, formando a atual biosfera. Através da fotossíntese, as microalgas são capazes de absorver CO_2 e liberar O_2 e água, o que lhes confere cerca de 60% da produtividade primária do planeta (DERNER, 2006).

Podem ser classificadas como procarióticas ou eucarióticas (OLAIZOLA, 2003), sendo as procarióticas representadas pelas classes Cyanophyceae (cianobactérias) e Prochlorophyceae, e as eucarióticas pelas classes Bacilariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos) e Cryptophyceae (criptomônadas), além de Prasinophyceae e Chlorophyceae (algas verdes) (YONEDA, 1999).

Geralmente são unicelulares, mas algumas se apresentam em colônias ou filamentos. Podem ser fotoautotróficas, heterotróficas (utilizando carbono orgânico extracelular na ausência de luz) ou mixotróficas (OLAIZOLA, 2003). Além disso, são coloridas pela presença de pigmentos fotossintéticos, que conferem uma coloração esverdeada a avermelhada, passando por tons de dourado (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). Uma das principais características das microalgas é a capacidade das mesmas de crescer nos ambientes mais diversos, desde lagos salinos até ambientes de água límpida. Além disso, podem servir como fonte de alimento ou de compostos químicos de interesse econômico (HENRIKSON, 1994).

A constituição química destes organismos é diversificada, por isso ganharam papel de destaque em inúmeras pesquisas desenvolvidas em áreas distintas, desde a produção de fármacos até a produção de biocombustíveis (CARDOZO et al., 2007). De acordo com Borowitzka (1999), o Japão foi pioneiro no cultivo comercial de microalgas em larga escala através da cultura de *Chlorella* nos anos 60. Nos anos seguintes, destacaram-se México, Estados Unidos e China, pelo cultivo de *Spirulina* como alimento. Diversas espécies foram utilizadas como ração na aquicultura, sendo *Dunaliella salina* cultivada para extração de β-caroteno e *Haematococcus pluvialis* para extração de astaxantina.

A década de 80 representou o advento da biotecnologia microalgal, novas pesquisas foram desenvolvidas e outras aplicações começaram a ser difundidas, como sua utilização em

produtos farmacêuticos, bioquímicos e fertilizantes. Devido ao fato das microalgas poderem ser utilizadas para a produção de metano ou hidrogênio, passaram a ser objeto de estudos como fonte energética (COSTA et al., 2008; SCRAGG et al., 2003). A Figura 2.1 apresenta um esquema com as diversas aplicações da biomassa de algas, em razão das vantagens descritas.

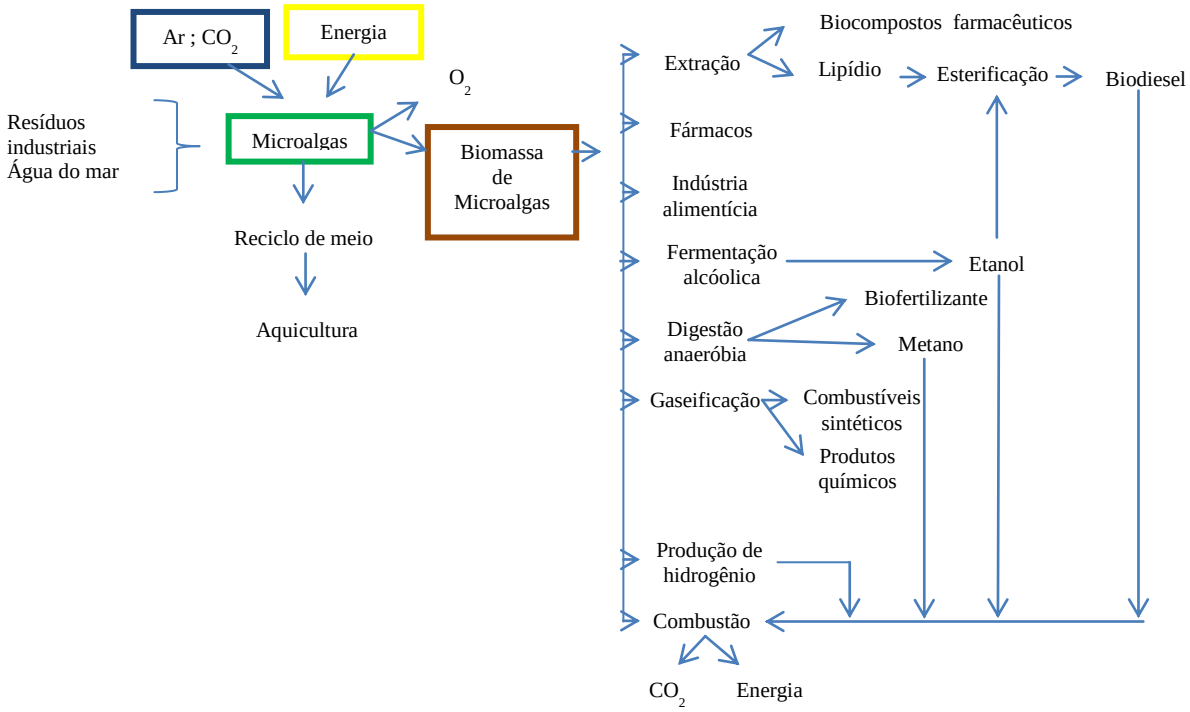

Figura 2.1 – Fluxograma das aplicações potenciais das microalgas (Fonte: adaptado de Costa e Morais, 2011).

A Tabela 2.1 mostra o desenvolvimento das pesquisas acerca das aplicações da biomassa de algas em diversos setores e regiões do mundo.

2.1.1 Haptophytas

A divisão Haptophyta é composta por organismos unicelulares que apresentam flagelo em parte do seu ciclo de vida. O destaque deste grupo refere-se à presença de uma estrutura em forma de fio denominada haptonema, sobre a qual não se conhece a verdadeira função, mas acredita-se que possa ser uma estrutura vestigial que auxilie na orientação e deslocamento em busca de alimentos (LOURENÇO, 2006). Desta forma, o nome Haptophyta é uma menção à estrutura, não existindo qualquer relação com algum dos gêneros do grupo.

Tabela 2.1 – Usos de microalgas.

Espécie	Área de pesquisa	País	Autor
Arthrospira	Nutrição humana e animal	França, EUA, China e Tailândia	PULZ e GROSS, 2007
Chlorella vulgaris	Produção de energia, tratamento de efluentes	México, Colombia	SANCHEZ e TRAVIESO, 1993; VALDERRAMA et al., 2002
Chlorella vulgaris	Digestão anaeróbia	França	RAS et al., 2011
Chlorella vulgaris, Eichhornia crassipes	Remoção de Nitrogênio	Vietnã, Malásia	BICH et al, 1999
Cyanobium sp	Cultivo	Brasil	HENRARD, 2009
Dunaliella tertiolecta	Crescimento em fotobiorreator	Finlândia	LAKANIEMI et al., 2012
Haematococcus pluvialis	Aquacultura	EUA, Índia, Israel	LORENZ et al., 2000
Isochrisis galbana	Perfil nutricional, produção de biodiesel	Espanha, EUA	TOKUSOGLU e ÜNAL, 2003
Phaeodactylum tricortunum	Caracterização e crescimento em fotobiorreator	Espanha	SANCHÉZ MIRÓN et al., 2003
Porphyridium cruentum	Extração de polissacarídeo	Israel	HEANEY-KIERAS e CHAPMAN, 1976
Spirulina sp	Nutrição humana	México, EUA	SPOLAORE et al., 2006
Spirulina LEB-18	Produção de biogás	Brasil	HENRARD et al., 2011
Spirulina maxima	Digestão anaeróbia	Canadá	SAMSON e LeDUY, 1982

Posteriormente, o nome da divisão foi alterado para Prymnesiophyta (Gr. *prymnesium*, cabo rígido + Gr. *phykos*, alga ou Gr. *phyton*, planta), utilizando-se o gênero *Prymnesium* como tipo. Entretanto, como a classificação já estava bem estabelecida, atualmente os dois nomes são mantidos. Duas classes compõem este grupo, a Prymnesiophyceae, representada pelo gênero *Isochrysis* e Pavlovophyceae, representada pelos gêneros *Pavlova*, *Diacronema* e *Exanthemachrysis* (REVIERS, 2006).

O gênero *Pavlova* apresenta um grande potencial antioxidante (LI et al., 2006), enquanto o gênero *Isochrysis* vem ganhando destaque no cenário atual em função da sua alta capacidade de produzir e acumular lipídios (LIU e LIN, 2001).

Os micro-organismos pertencentes ao grupo apresentam pigmentos como: clorofila a, clorofila c1, clorofila c2 e carotenóides como fucoxantina (e seus derivados), β-caroteno, diadinoxantina e diatoxantina. A coloração amarelada, em tons de dourado ou marrom, embora algumas espécies não apresentem fucoxantina, deve ser atribuída à elevada concentração de carotenóides (MACHADO, 2011).

Alguns destes micro-organismos são capazes de suportar mudanças ambientais bruscas que abrangem: variações de temperatura e irradiação, disponibilidade de nutrientes e salinidade, dentre outros. Para isso, os mesmos produzem metabólitos secundários que possuem grande valor econômico agregado (PLAZA et al., 2008).

Segundo Lee (2008) e Lourenço (2006), este grupo apresenta como produtos de reserva a crisolaminarina e lipídios, que são acumulados no citoplasma.

2.1.1.1 *Isochrysis galbana*

De acordo com Lee (2008), esta microalga pertence à seguinte classificação taxonômica (Figura 2.2):

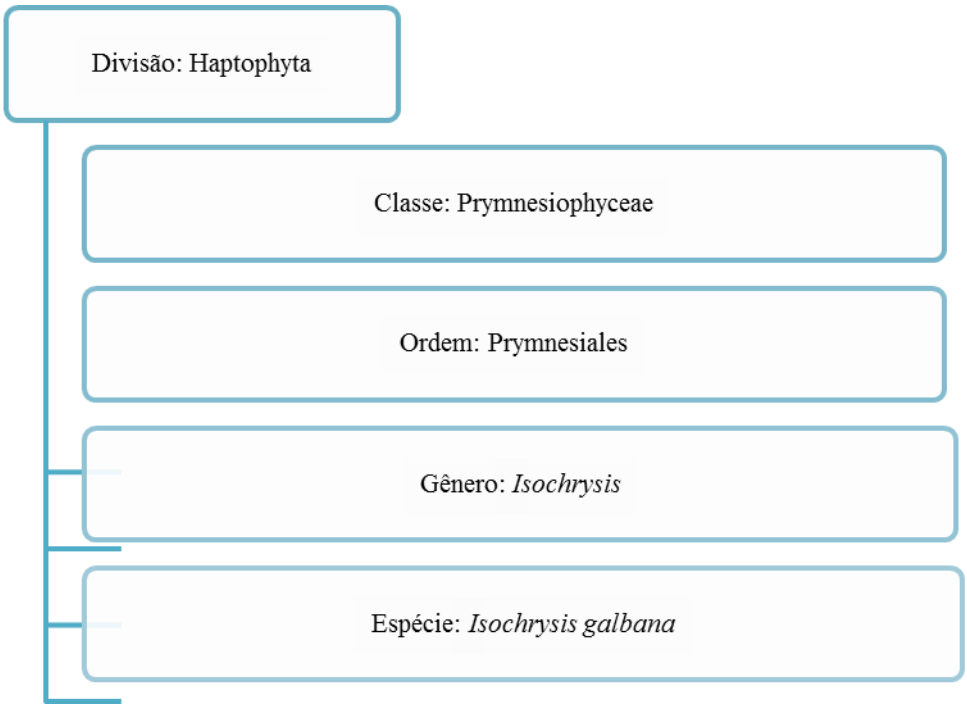

Figura 2.2 – Classificação taxonômica da microalga *Isochrysis galbana*

Suas células apresentam forma elíptica ou elipsoidal, com dimensões de 5-6 µm de comprimento, 2-4 µm de largura e 2,5-3 µm de espessura (Figura 2.3). São desprovidas de parede celular, mas em alguns exemplares é possível encontrar vestígios de um invólucro externo de natureza polissacarídica. São exclusivamente marinhas e utilizadas como fonte de alimento na aquicultura de larvas em estágio inicial de desenvolvimento, assim como de outros organismos marinhos (SÁNCHEZ et al., 2013).

Figura 2.3 – Foto dimensionada da microalga *Isochrysis galbana*. (Fonte: MACHADO, 2011).

De acordo com Lourenço (2006), a espécie *Isochrysis galbana* é muito utilizada na área farmacológica por apresentar elevadas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, o que lhe confere ótimas propriedades nutricionais.

2.1.2 Cultivo de microalgas

Por apresentarem uma alta de produtividade e crescimento acelerado, algumas espécies vêm se destacando no meio acadêmico, tornando-se alvo de diversos estudos (LOURENÇO, 1996). Spolaore et al. (2006) relatam que a fase exponencial de crescimento das microalgas é rápida, com duração de horas.

Scott et al. (2010) mencionam algumas precauções a serem tomadas no que se refere ao cultivo de microalgas: viabilidade do tipo de reator (aberto ou fechado), evitar contaminação e abastecimento de nutrientes. Seu grupo de estudo menciona que áreas abertas apresentam um menor custo de implementação e operação, entretanto não oferecem segurança contra a contaminação, além de serem instáveis no que se refere à temperatura da cultura.

Estudos sobre crescimento de microalgas vêm sendo desenvolvidos, utilizando-se efluentes industriais e domésticos como meio de cultura. Segundo Chinnasamy et al. (2010)

microalgas marinhas e de água doce apresentaram bom crescimento quando em meio de cultura com cerca de 90% de efluente industrial e 10% de efluente doméstico.

Vonshak (1997) menciona que o uso de efluentes industriais para o crescimento de algas seria a solução para um problema, pois agregaria valor a um produto, gerando um potencial para os biocombustíveis.

A redução de custos é o principal atrativo para o tratamento de águas residuárias com algas. Como exemplo, é possível observar a geração de oxigênio por algas, o que dispensaria a utilização de equipamentos de aeração (MALLICK, 2002). Munoz e Guieysse (2006) reportam a eficiência da biorremediação em lagoas facultativas e mencionam que o resíduo gerado neste tratamento apresenta menor potencial poluidor.

Pittman et al. (2011) relatam que efluentes industriais podem ser ricos em cádmio ou mercúrio, e em altas concentrações podem ser tóxicos, influenciando negativamente o crescimento celular.

Ruiz-Marin et al. (2010) relatam que a tolerância a condições adversas varia de acordo com a espécie, conforme demonstrado em estudos em que a espécie *Scenedesmus obliquo* apresentou melhor crescimento em águas residuárias de origem doméstica quando comparado ao crescimento exibido por *Chlorella vulgaris*.

Elevadas concentrações de ferro no meio e estresse nutricional podem induzir ao acúmulo de lipídios em algumas espécies como, por exemplo, *Chlorella vulgaris* (LIU et al., 2008 e PICARDO, 2012).

A produção de biomassa pode ser desenvolvida em lagoas (Figura 2.4) ou em fotobiorreatores (Figura 2.5), sendo estes últimos considerados mais dispendiosos, embora apresentem maior produtividade (Tabela 2.2) (RICHMOND, 2004).

Figura 2.4 – Tanques elípticos para o cultivo de *Arthospira platensis* na Fazenda New Ambadi, Índia (Fonte: Lourenço, 2006).

Figura 2.5 – Fotobiorreator tubular com capacidade de 1000L na Universidade de Murdoch, Austrália (Fonte: Chisti, 2007).

Tabela 2.2 – Comparação entre fotobiorreator e lagoa (Fonte: Chisti, 2007).

Variável	**Fotobiorreator**	**Lagoa**
Produção anual de biomassa (kg)	100.000	100.000
Produtividade volumétrica (kg/m^3/d)	1,535	0,117
Produtividade de área (kg/m^2/d)	0,048[a]	0,035[b]
	0,072[c]	
Concentração da biomassa em suspensão (kg/m^3)	4	0,14
Taxa de diluição (d)	0,384	0,25
Área necessária (m^2)	5681	7828
Rendimento de óleo (m^3/ha)	136,9[d]	99,4[d]
	58,7[e]	42,6[e]
Consumo de CO_2 anual (kg)	183.333	183.333
Geometria do sistema	132 tubos paralelos / unidade	978 m^2 por lagoa
	80 m de comprimento	12 m de largura
	0,06 m de diâmetro	0,30 m de profundidade
Número de unidades	6	8

[a] Área total; [b] Área atual da lagoa; [c] Área projetada dos tubos do fotobiorreator; [d] Biomassa com alto teor de óleo; [e] Biomassa com baixo teor de óleo

Os fotobiorreatores podem apresentar custo elevado em função da necessidade de se manter a esterilidade durante todo o processo e da necessidade de agitação para a mistura, mas talvez este custo possa ser compensado pela elevada concentração celular atingida (SCOTT et al., 2010).

Visando a viabilidade econômica do cultivo é importante promover uma conexão entre os produtos e co-produtos gerados. Neste sentido, o fotobiorreator apresenta vantagem por ser um sistema fechado (CHISTI, 2008).

De acordo com Plaza et al. (2008), o cultivo de microalgas vem sendo considerado uma boa alternativa para a produção de compostos sintéticos por apresentar as seguintes vantagens:

- Grande variabilidade de espécies;
- Facilidade de cultivo;
- Crescimento rápido;
- Não sazonalidade;
- Baixo custo operacional do cultivo;
- Possibilidade de manipulação metabólica.

Vários autores relatam que o cultivo é de fácil implementação e operação, pois não exige irrigação, herbicidas ou pesticidas (DISMUKES et al., 2008; RODOLFI et al., 2009; BRENNAN e OWENDE, 2010).

2.1.3 Sequestro de carbono

A captura e estocagem de CO_2 é uma tecnologia importante, pois permite que a sociedade se desenvolva e, simultaneamente, tente minimizar os efeitos deste desenvolvimento no clima do planeta (PIRES et al., 2012).

As microalgas utilizam o CO_2 atmosférico para crescer e se multiplicar, embora o CO_2 não seja abundante no ar atmosférico. No entanto, gases oriundos de indústrias são ricos em CO_2, o que pode se tornar uma ótima estratégia para reduzir a emissão de gases poluentes e fomentar o crescimento de microalgas (LAM e LEE, 2012). As microalgas são capazes de sequestrar mais CO_2 quando comparadas às plantas terrestres, no que se refere à biomassa produzida (ROSENBERG, 2011).

De acordo com Rosenberg et al. (2011), a constante disponibilidade de CO_2 é um atrativo para o cultivo de microalgas associado a biorrefinaria.

De acordo com Sydney et al. (2010), o carbono capturado pode ter destinos diversos, como a produção de hormônios e polissacarídeos, e a produção de biomassa seria devido a apenas uma parte do CO_2 biofixado.

O sequestro de CO_2 por microalgas é um processo oneroso e sua compensação está relacionada aos benefícios que a técnica propicia como, por exemplo, a conversão de CO_2 em biomassa de microalgas e a produção de produtos de alto valor agregado (PIRES et al., 2012).

Existem poucas publicações relacionadas aos custos do cultivo de microalgas; entretanto, Posten (2009) definiu um valor máximo de 40€/m^2 de terra para a construção de fotobiorreatores. Assim, considera-se que a combinação da fixação de CO_2, tratamento de efluentes gasosos e resíduos da produção de biocombustíveis com o cultivo de microalgas possa diminuir o ônus do processo e tornar-se uma alternativa promissora no sequestro de CO_2.

2.1.4. Potencial para biocombustível

O biocombustível de microalgas, conhecido como biocombustível de terceira geração, libera gases de combustão com características menos nocivas, se comparados aos gerados na queima do diesel oriundo de petróleo. Em sua queima, ocorre uma redução de aproximadamente 98% na emissão de dióxido de enxofre e 50% na emissão de partículados (BROWN e ZEILER, 1993; SHEEHAN et al., 1998). Bozbas (2008) afirma que adição de 20% de biodiesel na composição do combustível fóssil representa uma redução de 15% na emissão de CO_2. Assim, observa-se que os biocombustíveis podem ser adicionados em pequena proporção ao combustível tradicional, sem comprometer o bom desempenho do motor (SÁNCHEZ et al., 2013).

Segundo diversos autores (AHMAD, 2011; HUANG et al., 2010; SHIRVANI et al., 2011; SÁNCHEZ et al., 2013), o uso de biodiesel proveniente de microalgas apresenta diversas vantagens, dentre elas:

- Acelerado crescimento da biomassa algal;
- Elevado rendimento;
- Menores áreas de cultivo exigidas;
- Sequestro de carbono associado ao crescimento;
- Ausência de enxofre;
- Não toxicidade;
- Alta biodegradabilidade.

De acordo com Miao e Wu (2004), uma das vantagens d plantas e microalgas sobre os materiais lignocelulósicos se trata do elevado valor calorífico e baixa densidade. Tais propriedades mostram-se adequadas para a produção de biocombustíveis. Costa e Morais (2011) relatam valores de 1,72 e 1,38 para a relação Hidrogênio: Carbono, na molécula para

biocombustíveis oriundos de microalgas e de plantas, respectivamente. Valores de 0,26 e 0,37 são também relatados para a relação Oxigênio: Carbono, para biocombustíveis oriundos de microalgas e plantas, respectivamente. Além disso, relatam que o biocombustível gerado a partir de microalgas é mais estável do que o obtido a partir de plantas, em razão do baixo conteúdo de oxigênio. Uma outra vantagem apresentada pela biomassa de algas em detrimento de plantas terrestres e outras fontes de matéria-prima é sua produtividade por área (Tabela 2.3).

Chisti (2007) e Schenk et al. (2008) relatam valores de referência de 10-50 g de metano/m^2/d (36,5-183 toneladas/ha/ano) para plantas, enquanto Pulz (2007) citou 98 g de metano/m^2/d (358 toneladas/ha/ano) para microalgas. Para a palha de milho, sorgo e cana-de-açúcar são citados valores de produtividade de 13-24, 73-87 e 44 toneladas de biomassa/ha/ano, respectivamente (HUBER et al., 2006). Bruhn et al. (2011) e Chuang et al. (2011) mencionam produtividades de 45 e 100 toneladas/ha/ano para *Ulva lactuca* e *Eichhornia crassipes* (aguapé), respectivamente. As estimativas supracitadas reforçam o elevado potencial das microalgas como fonte primária para a produção de bioenergia (Tabela 2.4).

Tabela 2.3 – Fontes de produção de biodiesel. Fonte: Mata et al. (2010).

Fonte	**% Óleo/ Biomassa**	**L de óleo/ (ha.ano)**	**m^2 /(Kg de biodiesel.ano)**	**Produtividade do Biodiesel (Kg de Biodiesel / (ha.ano))**
Milho (*Zea mays L.*)	44	172	66	152
Cânhamo (*Cannabis sativa L.*)	33	363	31	321
Soja (*Glycine max L.*)	18	636	18	562
Pinhão manso (*Jatropha curcas L.*)	28	741	15	656
Camelina (*Camelina sativa L.*)	42	915	12	809
Canola (*Brassica napus L.*)	41	974	12	862
Girassol (*Helianthus annuus L.*)	40	1070	11	946
Mamona (*Ricinus communis*)	48	1307	9	1156
azeite de dendê (*Elaeis guineensis*)	36	5366	2	4747
Microalgas (baixo teor de óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalgas (médio teor de óleo)	50	97800	0,1	86515
Microalgas (alto teor de óleo)	70	136900	0,1	121104

Tabela 2.4 – Comparação de fontes de biodiesel, considerando o atendimento a 50% do combustível utilizado pela frota dos EUA. Fonte: Adaptado de Chisti (2007)

Cultura	**Área de cultivo (Mha)**	**Área de cultivo nos EUA (%)**
Milho	1540	846
Soja	594	326
Canola	223	122
Pinhão manso	140	77
Coco	99	54
Óleo de palma	45	24
Microalgas (baixo teor de óleo)	4,5	2,5
Microalgas (alto teor de óleo)	2	1,1

Observa-se que as microalgas apresentam elevado rendimento, necessitando de uma menor área quando comparadas às demais culturas (menos de 3%), demonstrando assim sua alta competitividade (CHISTI, 2007).

As microalgas possuem a capacidade de acumular lipídios que, associada ao alto rendimento fotossintético (habilidade de converter energia solar em biomassa), as tornam mais atrativas para a produção de biodiesel. Enquanto as plantas terrestres apresentam um rendimento fotossintético de 0,5%, nas microalgas este é de cerca de 3 a 8% (LARDON et al., 2009). Tais características, em conjunto com a competição moderada por nutrientes e a possibilidade de sequestro de CO_2, têm fomentado pesquisas de produção de biodiesel envolvendo microalgas (LARDON et al., 2009).

A eficiência das etapas envolvidas nesta produção é altamente dependente da composição da alga, que varia de acordo com a espécie. Assim, fatores como crescimento e composição interferem diretamente na produtividade, que é representada pela concentração de óleo produzida, de acordo com a Tabela 2.5 (CHISTI, 2007).

Algumas pesquisas buscaram a produção de óleos a partir de micro-organismos heterotróficos utilizando fontes de carbono orgânico natural como o açúcar. No entanto, o resultado não demonstrou eficiência, pois as fontes de carbono para suprir estes micro-organismos devem ser produzidas através da fotossíntese (RATLEDGE, 1993; RATLEDGE e WYNN, 2002).

A partir da produção de 100 toneladas de biomassa de algas, estima-se que estejam sendo fixadas 183 toneladas de dióxido de carbono dado que a quantidade de carbono por peso seco equivale a aproximadamente 50% na biomassa (SÁNCHEZ MIRÓN et al., 2003). No entanto, gases industriais podem ser utilizados para este crescimento, uma vez que não há exigência de grau de pureza, o que implica em menor custo de processo (KURANO et al.,

1995). Sawayama et al. (1995) e Yun et al. (1997) sugerem a utilização do dióxido de carbono lançado por usinas termelétricas a base de combustíveis fósseis, o que não atribuiria qualquer custo adicional ao processo.

De acordo com Singh et al. (2011), Células Combustíveis Microbianas (Microbial Fuel Cells - MFC) vêm se destacando, em escala laboratorial, no que se refere à produção limpa de energia, embora não sejam adequadas ao transporte e necessitem de mais pesquisas para seu desenvolvimento, pois esta tecnologia não consegue gerar quantidades substanciais de energia com relação custo/benefício apropriada (LOVLEY, 2006).

Tabela 2.5 – Teor de lipídios e produtividade de diferentes espécies de microalgas. Fonte: Mata et al. (2010).

Espécies de microalga	**Teor de lipídios (% Biomassa seca)**	**Produtividade de lipídios (mg/L/dia)**	**Produtividade de biomassa por área ($g/m^2/dia$)**
Ankistrodesmus sp.	24,0 - 31,0	-	11,5 - 17,4
Botryococcus braunii	25,0 - 75,0	-	3
Chaetoceros muelleri	33,6	21,8	-
Chaetoceros calcitrans	14,6 - 16,4/39,8	17,6	-
Chlorella emersonii	25,0 - 63,0	10,3 - 50,0	0,91 - 0,97
Chlorella protothecoides	14,6 - 57,8	1214	-
Chlorella sorokiniana	19,0 - 22,0	44,7	-
Chlorella vulgaris	5,0 - 58,0	11,2 - 40,0	0,57 - 0,95
Chlorella sp.	10,0 - 48,0	42,1	1,61 - 16,47/25,0
Chlorella pyremoidosa	2	-	72,5/130,0
Chlorella	18,0 - 57,0	18,7	3,5 - 13,9
Chlorococcum sp.	19,3	53,7	-
Crypthecodinium cohnii	20, 0 - 51,1	-	-
Dunaliella salina	6,0 - 25,0	116	1,6 - 3,5/20,0 - 38,0
Dunaliella primolecta	23,1	-	14
Dunaliella tertiolecta	16,7 - 71,0	-	-
Dunaliella sp.	17,5 - 67,0	33,5	-
Ellipsoidion sp.	27,4	47,3	-
Euglena gracilis	14,0 - 20,0	-	-
Haematococcus pluvialis	25	-	10,2 - 36,4
Isochrysis galbana	7,0 - 40,0	-	-
Isochrysis sp.	7,1 - 33,0	37,8	-
Monodus subterraneus	16	30,4	-
Monallanthus salina	20,0 - 22,0	-	12
Nannochloris sp.	20,0 - 56,0	60,9 - 76,5	-
Nannochloropsis oculata	22,7 - 29,7	84,0 - 142,0	-
Nannochloropsis sp.	12,0 - 53,0	37,6 - 90,0	1,9 - 5,3
Neochloris oleoabundans	29,0 - 65,0	90,0 - 134,0	-
Nitzschia sp.	16,0 - 47,0	-	8,8 - 21,6

Oocystis pusilla	10,5	-	40,6 - 45,8
Pavlova salina	30,9	49,4	-
Plavlova lutheri	35,5	40,2	-
Porphyridium cruentum	9,0 - 18,8/60,7	34,8	25
Scenedesmus sp.	19,6 - 21,1	40,8 - 53,9	2,43 - 13,52
Skeletonema sp.	13,3 - 31,8	27,3	-
Skeletonema costatum	13,5 - 51,3	17,4	-

2.2. Digestão Anaeróbia de Biomassa de Algas

Apesar do alto ganho ambiental que os biocombustíveis oferecem, o processo de produção de biodiesel a partir de microalgas gera um excesso de biomassa em função de sua elevada taxa de reprodução em condições ideais de temperatura e aporte de nutrientes. Esta biomassa residual precisa ser reutilizada ou descartada de forma adequada no ambiente. Do contrário, o mesmo processo que visa reduzir a poluição atmosférica pode ser responsável por poluir solos e corpos hídricos, transferindo o problema de um compartimento ambiental para outro (GOLUEKE et al., 1957).

O descarte de biomassa de microalgas nos corpos hídricos resultará no seu depósito e degradação anaeróbia no fundo, levando à liberação de amônia e fosfato. O aumento da concentração de nutrientes em corpos hídricos acarreta uma elevação acentuada no crescimento de algas e demais organismos aquáticos, fato que leva à depreciação da qualidade das águas e inviabiliza seu uso. A este fenômeno dá-se a denominação de eutrofização (ESTEVES, 2011).

A eutrofização pode ser classificada como natural ou artificial. Quando o processo ocorre de forma lenta, em decorrência da erosão das rochas ou de lixiviação de solos, é classificado como natural. Entretanto, se o fenômeno ocorre de forma acelerada e antrópica, como consequência do aumento populacional, do lançamento de efluentes não tratados e do avanço tecnológico, é classificado como artificial (ESTEVES, 2011; BRAGA et al., 2005).

Diversos fatores podem interferir no fenômeno de eutrofização, acelerando-o ou retardando-o, como por exemplo, a radiação solar, a temperatura, a profundidade do corpo d’água, a velocidade do fluxo d´água e o tempo de residência no corpo d’água (BRAGA et al., 2005; VON SPERLING, 2011).

Os métodos de conversão da biomassa podem ser classificados como termoquímico ou biológico, sendo ambos, responsáveis por fornecer eletricidade através da combustão e o segundo, por produzir biocombustíveis a serem utilizados no transporte (COSTA e MORAIS, 2011).

Assim, uma forma de se evitar o descarte direto da biomassa residual no ambiente seria o seu aproveitamento para geração de energia na forma de metano, através da digestão anaeróbia.

Com o crescimento do interesse pela geração de metano, que é uma fonte de energia renovável, frente à crise do petróleo que assolava os anos 70, a digestão anaeróbia passou a ser vista como uma tecnologia promissora para a geração de energia, aliada ao fato de degradar diversos compostos orgânicos complexos em formas mais simples (Figura 2.6) (SIALVE et al., 2009).

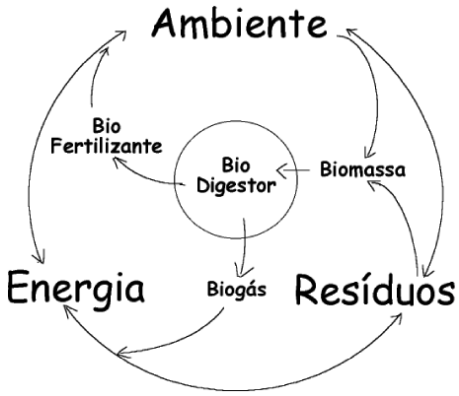

Figura 2.6 – Biociclo da digestão. Fonte: Muniz (2002).

Segundo Henrard (2009), quando o processo de digestão anaeróbia é comparado a outras tecnologias de produção de biocombustíveis, destaca-se por:

- Gerar biogás advindo da degradação biológica da matéria orgânica presente na biomassa;
- Simplicidade operacional;
- Menor gasto energético;
- Menor geração de resíduos.

O processo de digestão anaeróbia envolve a transformação da matéria orgânica em biogás, formado principalmente por CH_4 e CO_2. Tal processo é a principal alternativa adotada para o tratamento de resíduos agroindustriais e urbanos, tornando possível sua adequação às legislações ambientais vigentes. Atualmente, surgiu sua adoção como medida para a produção de biocombustíveis, pela geração de metano e bio-hidrogênio (COONEY et al., 2007; YANG et al., 2007).

O biogás produzido na digestão anaeróbia pode ser obtido a partir de esgotos domésticos, excrementos de animais e resíduos sólidos, como ervas daninhas, sobras de frutas

e legumes, folhas ou plantas, ou a partir de biomassa aquática, como macro e microalgas ou plantas marinhas (OMER e FADALLA, 2003; GUNASEELAN, 1997). Sua aplicabilidade pode ser observada em diversos estudos sobre digestão de esterco, lodo de esgoto e resíduos orgânicos urbanos e/ou industriais (LAKANIEMI et al., 2013).

2.2.1. Etapas da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo resultante das interações entre um grupo heterogêneo de micro-organismos e os substratos, que ocorre na ausência de oxigênio, usando CO_2, nitrato e sulfato como aceptores de elétrons e em consequência produz metabólitos como metano (55% a 75%) e CO_2 (25% a 45%). A formação de metano ocorre preferencialmente em ambientes onde oxigênio, nitrato e sulfato não estejam prontamente disponíveis como aceptores de elétrons. A digestão anaeróbia pode ser dividida em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, as quais contam com grupos microbianos específicos (Figura 2.7).

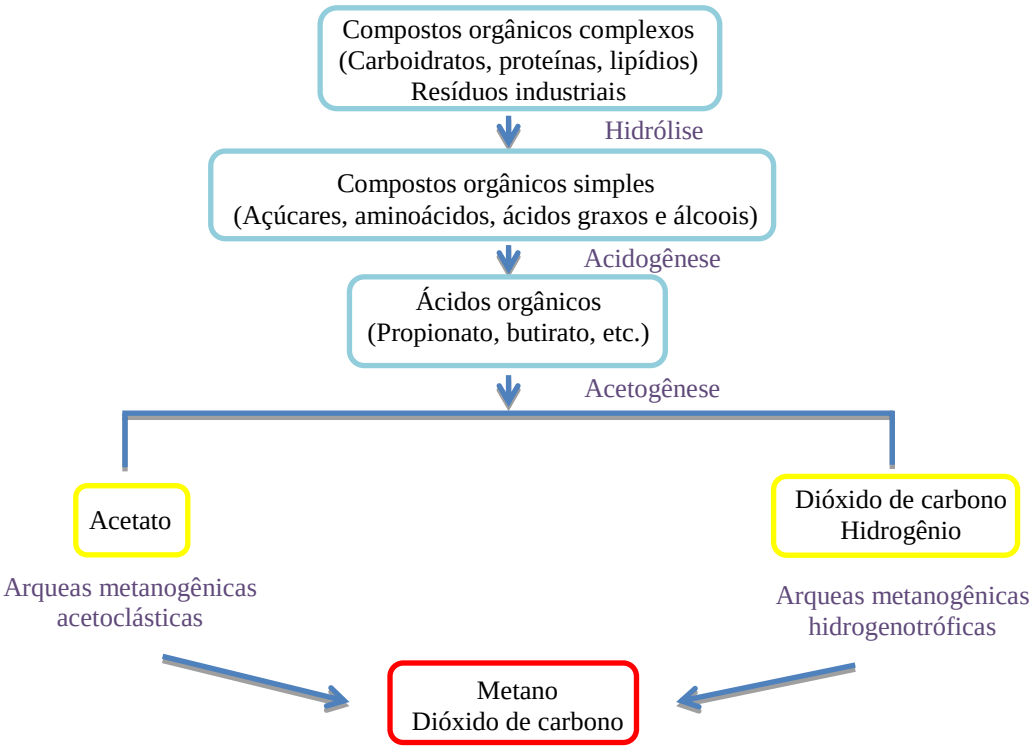

Figura 2.7 – Etapas da digestão anaeróbia. (Fonte: adaptado de Chernicharo, 2007)

Etapa de hidrólise

Nesta fase, ocorre a fragmentação de moléculas complexas em moléculas simples, como por exemplo, a conversão de carboidratos em açúcares simples e de proteínas em aminoácidos (CHANDRA et al., 2012). Estas moléculas mais simples, uma vez fragmentadas e dissolvidas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas são capazes de atravessar a parede celular de bactérias fermentativas. Além disso, fatores como temperatura, tempo de retenção hidráulica, composição do substrato, pH do meio, tamanho das partículas, concentração de amônia e de subprodutos formados, podem alterar o processo (CHERNICHARO, 2007).

Etapa acidogênica

A fermentação de açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, produzidos na fase hidrolítica, resulta na formação de álcoois, ácidos orgânicos, cetonas, dióxido de carbono, hidrogênio e biomassa celular. Entretanto, este processo só ocorre devido à atuação de bactérias fermentativas acidogênicas, as quais são capazes de metabolizar os compostos produzidos anteriormente (CHERNICHARO, 2007). Chandra et al. (2012) relatam que quanto maior a pressão parcial de hidrogênio, maior a formação de compostos reduzidos.

Etapa acetogênica

Segundo Chernicharo (2007), a oxidação de compostos como propionato e butirato em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, caracteriza esta etapa. Entretanto, grande quantidade de hidrogênio é formada associada à formação de acetato e com isso pode ocorrer uma diminuição do pH, sendo necessária a presença de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, que são capazes de remover o hidrogênio da fase líquida.

Esta etapa é fortemente correlacionada com a formação de metano, uma vez que as bactérias específicas desta fase convivem em simbiose com as arqueas produtoras de metano. O hidrogênio é também usado para a formação de metano (CHANDRA et al., 2012).

Etapa metanogênica

Esta etapa utiliza como precursores de metano, hidrogênio, metanol, acetato e CO_2, sendo este último usado como aceptor final de elétrons (CHANDRA et al., 2012).

Para a formação de metano são destacados dois grupos de micro-organismos: as arqueas metanogênicas acetoclásticas, são responsáveis por metabolizar o acetato formado anteriormente, daí provendo cerca de 60% a 70% da produção de metano e são também capazes de formar CO_2. Já as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas utilizam o dióxido de carbono e o hidrogênio produzidos para formar mais metano (CHERNICHARO, 2007).

2.2.2. Fatores de influência na digestão anaeróbia

pH

O pH pode implicar em algumas modificações no processo de digestão anaeróbia, como a atividade enzimática, através da alteração da conformação proteica, e a toxicidade de compostos, através da volatilização da amônia, por exemplo (CHERNICHARO, 2007). Para cada tipo de substrato é requerido um pH específico, conforme mostra a Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Especificidade de degradação de substratos a cada faixa de pH (Fonte: Chernicharo, 2007).

Substrato	pH ótimo
Formiato	6,8 a 7,3
Acetato	6,5 a 7,1
Propionato	7,2 a 7,5

As arqueas metanogênicas apresentam atividade bioquímica satisfatória no intervalo de pH entre 6,8 e 7,5 (SIALVE et al., 2009). Segundo Chernicharo (2007), este intervalo situa-se entre 6,6 e 7,4.

Como o processo anaeróbio tem como objetivo a formação de metano e ocorre em cadeia, onde subprodutos de uma etapa são utilizados na próxima fase, o controle de pH visa minimizar os riscos de inibição do processo (CHERNICHARO, 2007).

Toxicidade da amônia

O pH é responsável pela proporção existente entre os íons NH_4^+ e NH_3. Segundo Chernicharo (2007), para valores de pH superiores a 7,2 a amônia gasosa ou livre (NH_3) pode ter seus níveis aumentados, tornando-se inibidora do processo anaeróbio.

McCarthy (1964) descreve que elevadas concentrações de amônia (NH_3) e alcalinidade podem levar à inibição do processo anaeróbio. Samson e LeDuy (1982) e Sanchez e Travieso (1993) mencionam uma elevada concentração de ácidos graxos voláteis

como consequência do efeito tóxico da amônia. A concentração de amônia acarreta diversas consequências sobre os processos anaeróbios, como pode ser observado na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Efeitos da amônia livre sobre os processos anaeróbios (Fonte: Chernicharo, 2007).

Concentração de N (mg/L)	**Efeito**
50 a 200	Benéfico
200 a 1000	Não tem efeito adverso
1500 a 3000	Inibidor para pH > 7,4 a 7,6
acima de 3000	Tóxico

Toxicidade por sulfeto

A formação de H_2S está diretamente relacionada à redução de sulfato (SO_4^{2-}). Quando o sulfato está presente no meio ocorre uma competição entre arqueas metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias sulfatorredutoras, podendo o pH e a relação DQO/SO_4^{2-} serem alterados (CHERNICHARO, 2007).

De acordo com Chernicharo (2007), relações mássicas DQO/SO_4^{2-} inferiores a 7 implicam em uma forte inibição da atividade metanogênica; entretanto, este valor deve estar associado ao pH. Relações DQO/SO_4^{2-} maiores que 10 apresentam menor efeito inibidor, pois o biogás produzido fará com que o H_2S seja removido da fase líquida. Para pH < 7, predomina a forma não dissociada (H_2S), mais tóxica, e para pH > 7, predomina a forma dissociada (HS^-), menos tóxica. Entretanto, é possível obter um processo estável para valores de pH abaixo de 7, devido ao fato do sulfeto ser encontrado em baixa quantidade nas microalgas. Na faixa de pH relacionada ao tratamento de efluente, o sulfeto livre (S^{2-}) apresenta-se em concentrações desprezíveis.

O enxofre é requerido em quantidades mínimas para o crescimento celular. Entretanto, o H_2S presente na composição do biogás pode ocasionar problemas de corrosão em compressores e tubulações. Desta forma, sua presença justifica posteriores processos de purificação, compressão e estocagem do biogás (HENRARD, 2009). Além disso, a formação de H_2S pode inibir a atuação das arqueas metanogênicas, reduzindo a produção de metano (CHERNICHARO, 2007). Becker (1988) relata que substratos oriundos de microalgas raramente apresentam aminoácidos sulfurados, o que resulta em uma menor liberação de ácido sulfídrico em relação às demais fontes de substrato.

Alcalinidade e acidez

O equilíbrio entre acidez e alcalinidade está diretamente relacionado com a produção de metano, através da liberação de CO_2 e NH_4^+, que afetam o pH. Além disso, o estado de oxidação da biomassa influencia a qualidade do biogás produzido. A dinâmica encontrada na remoção e produção de ácidos graxos voláteis, expressos em mg HAc/L, influencia o valor de pH e o acúmulo de ácidos graxos voláteis pode ocasionar redução da atividade metanogênica (SIALVE et al., 2009).

Muitas etapas da degradação anaeróbia levam à formação de ácidos e estes contribuem para a produção de metano. O ácido acético é o mais importante para a formação do biogás. Na faixa de pH na qual a atividade metanogênica é considerada ótima, o tamponamento do sistema depende principalmente da relação gás carbônico/alcalinidade (CHERNICHARO, 2007).

A alcalinidade carbonácea, expressa em mg $CaCO_3$/L, é responsável pelo tamponamento e neutralização dos ácidos solubilizados, evitando que haja redução do pH em função da alta concentração destes ácidos. A Figura 2.8 apresenta o equilíbrio das espécies do sistema carbonato/bicarbonato em função do pH do meio, demonstrando qual espécie será predominante. Este parâmetro físico-químico é proveniente de diversas espécies químicas presentes no meio, mas principalmente do equilíbrio do carbono inorgânico, apresentado na Reação (1) (ANDRADE et al., 2008):

$$CO_2(aq) \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-} \quad (1)$$

Um fator que exerce influência sobre a alcalinidade é a degradação de proteínas, que eleva proporcionalmente a quantidade de amônia descarregada no meio (HENRARD, 2009). Entretanto, Chernicharo (2007) relata que a digestão de compostos como carboidratos e álcoois não produz alcalinidade, pois não leva a um cátion como produto final.

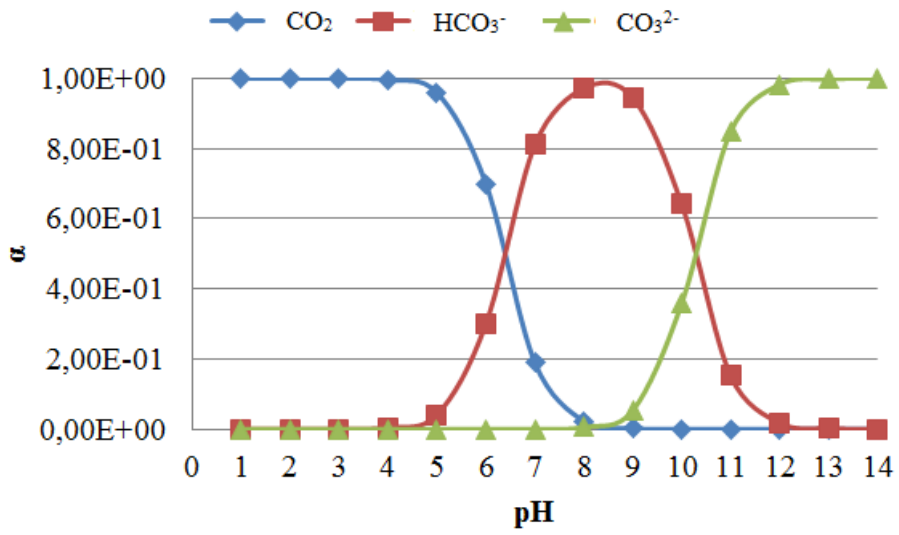

Figura 2.8 – Curvas de dissociação (α) x pH para as espécies do sistema carbonato. Fonte: Xavier (2012); Shriver (2008).

Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores que afetam o processo de degradação anaeróbia, pois é capaz de interferir no crescimento dos micro-organismos responsáveis pela digestão, nas reações enzimáticas, na taxa de difusão do substrato e na dissociação de compostos tóxicos, como por exemplo, a amônia (CHERNICHARO, 2007).

Para a digestão, existem três faixas de temperatura relacionadas ao crescimento de micro-organismos específicos: psicrófila (entre 4°C e 15°C), mesófila (entre 20°C e 40°C) e termófila (a partir de 45°C). Embora as faixas mesófila e termófila venham sendo pesquisadas, estudos têm demonstrado que a faixa termófila não se apresenta vantajosa em função do gasto de energia e da instabilidade do processo. Assim, faixas de temperatura mesófilas são as mais utilizadas nas pesquisas (CHERNICHARO, 2007).

Angelidaki e Ahring (1993) afirmam que a inibição do tratamento anaeróbio pode ser ocasionada por diversos fatores, tais como: tempo de aclimatação, natureza do substrato e do inóculo, condições de operação e temperatura, sendo esta última prejudicial em condições de termofilia (BRAUN et al., 1981; ANGELIDAKI e AHRING, 1994).

2.2.3. Produção de metano a partir da digestão anaeróbia de microalgas

A digestão anaeróbia de microalgas vem sendo objeto de estudo de diversos pesquisadores desde os anos 50, devido ao seu potencial de recuperação de energia. Registros

históricos citam que o primeiro trabalho desenvolvido sobre a digestão anaeróbia de biomassa de algas ocorreu em 1957 (GOLUEKE et al., 1957). Em 1960, foi proposta a associação da produção de microalgas em lagoa aberta com o tratamento de esgoto no intuito de recuperar energia da biomassa algal através da digestão anaeróbia, gerando metano (OSWALD e GOLUEKE, 1960).

Nos sistemas naturais, a degradação anaeróbia acontece quando células de algas submergem para regiões com ausência de luz e oxigênio. Ao submergirem, as mesmas morrem e se rompem, dando início ao processo de remineralização. Tal processo é responsável pelo reciclo de nutrientes, que culmina na liberação de amônia e fosfato que servirão de substrato para o crescimento de fitoplâncton (VANDENBROUCKE e LARGEAU, 2007).

A aplicação em conjunto do processo de produção de biomassa de algas com a digestão anaeróbia da biomassa residual possui poucos trabalhos publicados atualmente. Apesar disto, a premissa de se gerenciar a biomassa residual de algas atrelada ao interesse energético, controle de processos biológicos dos micro-organismos presentes no meio, e aproveitamento dos nutrientes presentes, como nitrogênio e fósforo, são fatores importantes a se considerar para a aplicação de tal metodologia em escala industrial (SIALVE et al., 2009).

De acordo com Vonshak (1997), a digestão anaeróbia de microalgas pode eliminar as etapas de colheita e secagem da biomassa, reduzindo seus respectivos custos (COSTA e MORAIS, 2011). Além disso, a geração de energia através da biomassa residual da extração de óleo na produção do biodiesel, apresenta-se como uma alternativa para otimizar a produção de energia a partir de microalgas e pode reduzir os custos do seu próprio cultivo (EHIMEN et al., 2009).

A biomassa residual oriunda da produção do biodiesel vem sendo analisada para dar origem a diversos tipos de biocombustíveis, dentre eles hidrogênio (YANG et al., 2010), metano (EHIMEN et al., 2009; YANG et al., 2011) e etanol (HARUN et al., 2010).

A produção de alguns destes biocombustíveis pode ser integrada, como é o caso do hidrogênio e do metano. Estudos demonstram a capacidade de produzir hidrogênio fotossinteticamente a partir de *Chlamydomonas reinhardtii*, sendo a biomassa restante degradada através do processo metanogênico, pois o sobrenadante apresenta altas concentrações de ácidos graxos voláteis utilizados na produção de metano e bioeletricidade (MUSSGNUG et al., 2010). Yang et al. (2011) mostraram rendimentos de 46 e 394 mL/g de hidrogênio e metano, respectivamente, a partir de biomassa após extração de lipídio. Além disso, Yang et al. (2011) comprovaram que a produção prévia de hidrogênio implica em

aumento no rendimento da produção subsequente de metano, obtendo-se um aumento de 22% na produção de metano.

2.2.3.1. Influência da composição das microalgas

Mussgnug et al. (2010) relatam que a digestão de microalgas pode variar de acordo com a composição de cada espécie. Além disso, o processo de produção de metano pode ser afetado por inúmeros fatores, dentre eles o tipo de substrato, o tipo de consórcio microbiano, e a concentração de metabólitos (LAKANIEMI et al., 2013). A Tabela 2.8 apresenta a variação da produção de metano, em litros de metano por grama de sólidos voláteis (SV), em função da concentração de compostos orgânicos na biomassa.

Tabela 2.8 – Rendimento de metano. Fonte: SIALVE et al. (2009)

Substrato	Composição	L CH_4/g SV
Proteínas	$C_6H_{13,1}O_1N_{0,6}$	0,851
Lipídios	$C_{57}H_{104}O_6$	1,014
Carboidratos	$(C_6H_{10}O_5)_n$	0,415

Tokusoglu e Ünal (2003) estudaram as microalgas e as caracterizaram em termos de umidade, proteínas, lipídios e carboidratos, de acordo com a Tabela 2.9 e Figura 2.9.

Tabela 2.9 – Composição aproximada de microalgas baseada em porcentagem de peso seco. Fonte: adaptado de Tokusoglu e Ünal (2003)

Parâmetros	Spirulina 1	Spirulina 2	Spirulina 3	Chlorella	Isochrysis
Umidade (%)	3,11 ± 0,05	4,08 ± 0,02	3,76 ± 0,04	3,87 ± 0,04	6,48 ± 0,03
Proteínas (%)	63,26 ± 0,04	64,43 ± 0,03	61,32 ± 0,02	47,82 ± 0,05	26,99 ± 0,08
Lipídios (%)	7,09 ± 0,03	7,14 ± 0,03	8,03 ± 0,06	13,32 ± 0,07	17,16 ± 0,04
Carboidratos (%)	15,17 ± 0,02	15,09 ± 0,04	15,81 ± 0,07	8,08 ± 0,09	16,98 ± 0,05

**Spirulina* 1, 2 e 3, variam de acordo com o percentual de umidade.

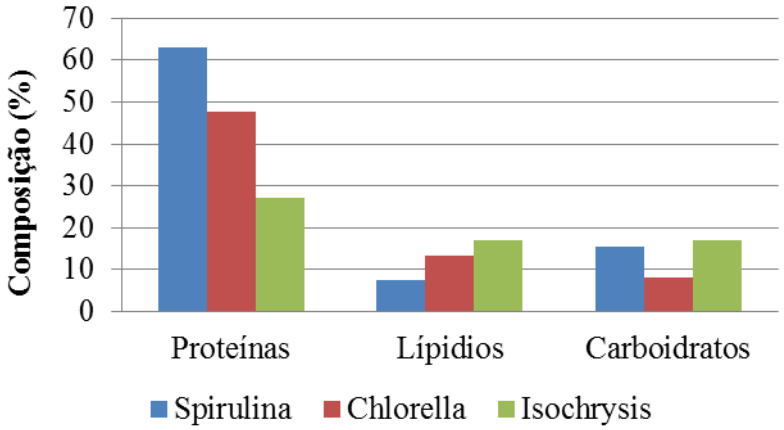

Figura 2.9 – Composição aproximada de microalgas (Fonte: adaptado de Tokusoglu e Ünal, 2003).

A concentração de proteínas em microalgas é considerada elevada, podendo representar mais de 50% da sua composição celular, entretanto estes valores podem apresentar variações de acordo com a composição química das células em questão. Em função do teor proteico das microalgas, a concentração de nitrogênio amoniacal gerada ao longo do processo de digestão anaeróbia pode tornar-se um fator limitante para a produção de biogás (HENRARD, 2009).

Segundo Tokusoglu e Ünal (2003), a microalga *Spirulina platensis* apresenta uma média de 63,00% de proteína, *Chlorella vulgaris* apresenta 47,82% e *Isochrisis galbana* apresenta 26,99%. Sabendo-se que concentrações mais baixas de proteína oferecem um menor risco ao processo de digestão anaeróbia, o uso de *Isochrisis galbana* mostra-se como o mais promissor na associação dos processos de sequestro de CO_2 e digestão anaeróbia.

Por apresentar um alto teor energético quando comparado aos hidratos de carbono e proteínas, os lipídios são altamente visados como fonte de nutrientes para a digestão anaeróbia, pois oferecem uma maior produção de biogás na sua degradação. Todavia, a hidrólise de lipídios é mais lenta do que a de proteínas e hidratos de carbono (CIRNE et al., 2007; LI et al., 2002).

Para concentrações de lipídios, Tokusoglu e Ünal (2003) mostram que *Isochrisis galbana* é capaz de acumular mais lipídios (17,16%) que *Chlorella vulgaris* (13,32%) e *Spirulina platensis* (7,53%). Estes resultados justificam sua utilização para a produção de biodiesel. Microalgas com maior concentração lipídica apresentam um maior rendimento de metano, no entanto problemas de transferência de massa podem ocorrer em virtude da aderência de gordura à superfície das células (LAKANIEMI et al., 2013).

Tokusoglu e Ünal (2003) avaliaram a concentração de carboidratos disponíveis em algumas espécies e sua análise revelou que a maior concentração é encontrada em *Isochrisis galbana* (16,98%), embora valores próximos sejam alcançados por *Spirulina platensis* (15,36%), afastando-se somente dos valores atingidos por *Chlorella vulgaris* (8,08%).

De acordo com Campos et al. (2010), a microalga *Isochrysis galbana* apresenta composição celular de 29,4 mg/L de proteína, 18,6 mg/L de carboidrato e 4,5 mg/L de lipídios.

Chernicharo (2007) relata que durante todo o processo anaeróbio são requeridos diversos nutrientes em diferentes etapas, devendo-se, assim, atender a esta demanda. Para estimular os organismos metanogênicos são necessários os seguintes nutrientes: nitrogênio,

enxofre, fósforo, ferro, cobalto, níquel, molibdênio, selênio, riboflavina e vitamina B_{12}. Além de descrever que a relação N:P necessária para suprir os micro-organismos é de 5:1.

Segundo Tokusoglu e Ünal (2003), a espécie *Isochrysis galbana* é rica em fósforo, com 1252,40 mg/100g de peso seco (Tabela 2.10), que é um importante macronutriente para a digestão anaeróbia. Microalgas também são ricas em diversos elementos minerais como, por exemplo, o cálcio.

Tabela 2.10 – Elementos minerais (mg/ 100 g de peso seco) na composição de microalgas (Fonte: adaptado de Tokusoglu e Ünal, 2003).

Microalga	Na	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	Se	P
Spirulina 1	1897,3 ± 0,04	1326,9 ± 0,02	883 ± 0,09	398,6 ± 0,01	90,1 ± 0,01	0,32 ± 0,06	2,45 ± 0,02	3,84 ± 0,08	0,13 ± 0,03	703,4 ± 0,03
Spirulina 2	988,6 ± 0,04	1504 ± 0,05	893 ± 0,11	368,3 ± 0,06	92,4 ± 0,02	0,49 ± 0,01	2,57 ± 0,06	3,80 ± 0,03	0,13 ± 0,04	746 ± 0,05
Spirulina 3	902,3 ± 0,02	1408 ± 0,04	703 ± 0,04	399,7 ± 0,09	103,6 ± 0,14	0,12 ± 0,21	3,01 ± 0,04	5,23 ± 0,08	0,11 ± 0,02	802,7 ± 0,02
Chlorella	1346,4 ± 0,177	49,92 ± 0,09	593,7 ± 0,07	344,3 ± 0,12	259,1 ± 0,04	0,06 ± 0,10	1,19 ± 0,07	2,09 ± 0,15	0,07 ± 0,03	1761,5 ± 0,02
Isochrysis	1109,2 ± 0,04	1193,2 ± 0,09	1081 ± 0,06	688,60 ± 0,1	228,4 ± 0,04	1,49 ± 0,14	2,74 ± 0,05	5,69 ± 0,02	1,02 ± 0,09	1252,4 ± 0,13

O aumento de acidez no sistema pode levar à inibição do processo anaeróbio (CHERNICHARO, 2007). Chen et al. (2008) retratam que altos valores de íons responsáveis pelo aumento da alcalinidade, como por exemplo Na^{+}, Ca^{2+} e Mg^{2+}, presentes na composição celular, são capazes de minimizar os efeitos inibitórios decorrentes do aumento da concentração de ácidos graxos voláteis.

Para Kugelman e McCarty (1965), McCarthy (1964) e Rinzema et al. (1988), concentrações entre 0,002 e 0,004 M de íons sódio são consideradas necessárias pelo consórcio anaeróbio; entretanto, valores acima de 0,14 M apresentam ação inibitória sobre o consórcio. Sabe-se que microalgas marinhas tem sido alvo de diversas pesquisas para a produção de biodiesel e posteriormente para a produção de metano, e para seu cultivo em laboratório faz-se necessário altas concentrações de cloreto de sódio (0,5 – 1M). Chen (1987) observou que concentrações até 0,3 M podem não apresentar quaisquer efeitos, a partir de 0,4 M exercem algum efeito e acima de 0,5 M é possível notar alterações no consórcio devido à toxicidade.

Apesar disso, estudos posteriores revelaram a possibilidade de se adaptar micro-organismos a elevadas concentrações de sal e condições em que íons sódio apresentariam menor efeito inibitório como, por exemplo, sob mesofilia (CHEN et al., 2008). Outra forma de minimizar a inibição por sódio é o uso de culturas de ambiente salino (LAKANIEMI et al.,

2013). A Tabela 2.11 apresenta alguns íons e a respectiva consequência de sua concentração na digestão anaeróbia.

Tabela 2..11 – Concentrações estimuladoras e inibidoras de alguns cátions (Fonte: Chernicharo, 2007).

Cátion	**Concentração (mg/L)**		
	Estimuladora	**Moderadamente inibidora**	**Fortemente inibidora**
Cálcio	100 a 200	2500 a 4500	8000
Magnésio	75 a 150	1000 a 1500	3000
Potássio	200 a 400	2500 a 4500	12000
Sódio	100 a 200	3500 a 5500	8000

2.2.3.2. Nutrientes

Grobbelaar (2004) relata uma composição média de microalgas dada por $CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01}$. A exigência de nitrogênio pode atingir valores de 8 a 16 toneladas de N/(ha.ano). No entanto, tais valores apresentam-se cerca de 55 a 111 vezes maiores do que para colza, planta de cujas sementes se extrai óleo para biodiesel (HALLEUX et al., 2008). A grande quantidade de amônia e fósforo envolvidas gera um grave problema econômico que tornaria o uso de microalgas não sustentável.

Etapas de tratamento para reciclar nutrientes, como nitrogênio e fósforo, são necessárias no mundo atual, com o objetivo de reduzir a exploração de tais elementos na natureza para a fabricação de fertilizantes. A digestão anaeróbia é capaz de mineralizar resíduos contendo nitrogênio e fósforo orgânicos, propiciando um reciclo de amônia e fosfato que podem servir até mesmo de substrato para microalgas (OLGUÍN, 2000; PHANG et al., 2000).

Por apresentar diversos nutrientes em sua composição, semelhantes aos utilizados nos meios de cultivo de microalgas, o efluente oriundo do tratamento anaeróbio é uma alternativa para produção da biomassa (FRANCK et al., 2009). Cantrell et al. (2008), Brennan e Owende (2010) e Kurano e Miyachi (2005) sugerem que resíduos de indústrias agro-alimentares sejam adicionados às culturas, como fonte de nitrogênio e fósforo, agregando valor aos rejeitos.

De acordo com Vasseur et al. (2012), a possibilidade de reuso do sobrenadante final do processo de tratamento da biomassa residual apresenta como vantagens:

- Fomentar o crescimento de novas culturas;
- Reduzir os custos com meio de cultura;
- Minimizar a geração de resíduos.

A relação C/N é descrita na literatura como sendo importante para o processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos. Parkin e Owen (1986) descrevem uma relação ótima entre 20/1 e 30/1; entretanto, o que geralmente se observa é uma proporção muito inferior, de cerca de 6/1, a qual é considerada insuficiente para a digestão anaeróbia. Proporções reduzidas de C/N podem acarretar maior formação e liberação de nitrogênio no sobrenadante e acúmulo de ácidos graxos voláteis no digestor. Segundo Speece (1996), valores de C/N inferiores a 20 representam um desequilíbrio para o consórcio microbiano. A ação de ambos os produtos gerados pode ocasionar a inibição do tratamento anaeróbio (YEN e BRUNE, 2007).

As razões C/N da biomassa de algas podem ser aumentadas reduzindo-se a síntese celular de proteínas e aumentando a via que leva à formação de carboidratos; isto pode ser alcançado através da limitação de nitrogênio no meio de cultivo (SHEEHAN et al., 1998).

Yen e Brune (2007) observaram uma melhoria significativa no rendimento da produção de metano mediante a adição de papel na biomassa de algas, valores de C/N entre 20-25 foram atingidos. Sob condições de temperatura mesofílica, tempo de retenção de 10 dias e carga orgânica de 4 g de sólidos voláteis/L/d os valores de metano produzidos variaram de 0,57 a 1,17 L/d, para amostras sem e com adição de papel (50%). Considerando as mesmas condições, a adição de 60% de papel e carga orgânica de 5 g de sólidos voláteis/L/d levou a produção de metano a valores de 1,61 L/d.

Segundo Angelidaki e Sanders (2004), o rendimento teórico do íon amônio proveniente da digestão anaeróbia pode ser previsto a partir do conhecimento da composição orgânica da célula. Valores de rendimento podem ser estimados através da Reação 1, que é uma adaptação do modelo proposto por Symons e Buswell (1933). De acordo com Chernicharo (2007), a Reação 1 considera a obtenção máxima de metano, desconsiderando a utilização de outras rotas e o consumo destinado ao crescimento celular. Entretanto, vale ressaltar que este modelo não prevê o anabolismo e o processo de manutenção celular.

$$C_aH_bO_cN_d + \left(\frac{4a-b-2c+3d}{4}\right)H_2O \rightarrow \left(\frac{4a+b-2c-3d}{8}\right)CH_4 + \left(\frac{4a-b+2c+3d}{8}\right)CO_2 + dNH_3 \qquad (1)$$

Sabe-se que a matéria orgânica é decomposta obedecendo a uma relação estequiométrica, sendo convertida a metano, dióxido de carbono e amônia. Com a equação da Equação 1 é possível estimar a produção específica de metano (B_0), expressa em L CH_4/g de sólidos voláteis (SIALVE et al., 2009).

$$B_0 = \frac{\frac{4}{8}a+\frac{1}{8}b-\frac{2}{8}c-\frac{3}{8}d}{12a+b+16c+14d} * V_m \quad (1)$$

onde V_m é o volume molar normal de metano.

A constante de reação entre metano e dióxido de carbono, (G) é descrita pela Equação 3, e o estado de oxidação médio do carbono no substrato pode ser obtido com a Equação 2 (HARRIS e ADAMS, 1979).

$$n = \frac{-b+2c+3d}{a} \quad (2)$$

$$r_G = \frac{4-n}{4+n} \quad (3)$$

Conforme mencionado anteriormente, o pH é um parâmetro extremamente importante no que se refere ao tratamento anaeróbio, pois seu valor irá determinar a capacidade de solubilização do CO_2 na fase líquida, o que implicará na composição do biogás. A Equação 4 permite quantificar o rendimento da produção de amônia em um digestor (SIALVE et al., 2009).

$$Y_{N-NH_3}(mg/g\ de\ SV) = \frac{d*17*1000}{12a+b+16c+14d} \quad (4)$$

onde SV é o teor de sólidos voláteis.

A Tabela 2.12 apresenta a composição celular por espécie e seus respectivos rendimentos de metano e amônia de acordo com a Equação 1. Diversos estudos reportam atingir percentuais de metano variando de 69% a 75%, independente da espécie de microalga e das condições de cultivo (SIALVE et al., 2009).

Tabela 2.12 – Rendimento de metano e amônia por espécie. Fonte: (Sialve et al., 2009)

Espécies	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	CH_4 (L CH_4 /g SV)	N-NH_3 (mg/g SV)
Euglena gracilis	39-61	14-20	14-18	0,53-0,8	54,3-84,9
Chlamydomonas reinhardtii	48	21	17	0,69	44,7
Chlorella pyrenoidosa	57	2	26	0,8	53,1
Chlorella vulgaris	51-58	14-22	12-17	0,63-0,79	47,5-54
Dunaliella salina	57	6	32	0,68	53,1
Spirulina máxima	60-71	6-7	13-16	0,63-0,74	55,9-66,1
Spirulina platensis	46-63	4-9	8-14	0,47-0,69	42,8-58,7
Scenedesmus obliquus	50-56	12-14	10-17	0,59-0,69	42,2-46,6

Embora existam inúmeros fatores capazes de interferir no processo de produção de metano, Chen et al. (2008) valorizam a etapa de adaptação do lodo anaeróbio como forma de aumentar a produtividade de metano, mesmo em presença de altas concentrações de amônia. Koster e Lettinga (1988) afirmam ter aumentado o limiar de toxicidade 6,2 vezes após realizarem uma etapa de adaptação.

2.2.3.3. Pré-tratamento da biomassa de microalgas

Estudos realizados por autores como Sialve et al. (2009) mostraram que, ao longo do processo de digestão anaeróbia, o material intracelular permanece intacto, isto significa que não ocorre o rompimento do envoltório celular (membrana).

Durante o tratamento anaeróbio diversas enzimas são produzidas pelo consórcio microbiano, mas caso a célula esteja íntegra, tais enzimas podem não ser capazes de atuar, reduzindo a biodegradação (SIALVE et al., 2009). No intuito de liberar o material retido dentro da célula, alguns estudos vêm sendo conduzidos para romper a membrana celular (YEN e BRUNE, 2007).

Chen e Oswald (1998) relatam que somente 40% dos constituintes das microalgas está disponível para a produção de metano, os 60% restante necessitam de etapas de pré-tratamento para externalizar o conteúdo intracelular.

Uziel (1978) observou em ensaios de biodegradação anaeróbia que, após 30 dias de incubação, as células permaneceram intactas. Ras et al. (2011) e Zamalloa et al. (2011) descrevem tempos de retenção de 20 a 30 dias para altos níveis de rendimento de metano. Entretanto, tempos de retenção maiores ou iguais a 30 dias não são favoráveis economicamente, pois oneram o processo (YANG et al., 2011).

Células vegetais são mais difíceis de serem rompidas por apresentarem celulose em sua constituição (NEVES, 2003). Assim, é necessário avaliar a necessidade de uma etapa prévia que aumente a biodisponibilidade da matéria orgânica para o consórcio microbiano, aumentando a biodegradação e diminuindo o tempo de retenção.

Algumas formas de pré-tratamento são bem conhecidas por aumentar a produção de metano a partir de lodos ativados e outros resíduos, dentre elas destacam-se tratamentos químicos (ácidos, bases, ozonização), térmicos e ultrassônicos (BONMATI et al., 2001; BOUGRIER et al., 2006). Os pré-tratamentos mecânico e químico têm sido aplicados em biomassa de algas, visando o aumento de sua biodegradabilidade (De SCHAMPHELAIRE e VERSTRAETE, 2009).

Os métodos físicos são mais favoráveis para o rompimento celular em função das limitações econômicas que acometem os demais métodos (SABOYA et al., 2003). Suas aplicações mais comuns são com o uso de homogeneizadores ou pérolas de vidro. A técnica que utiliza pérolas de vidro teve início no fim da década de 60 (NEVES, 2003). Neste caso, a ruptura é causada por forças de atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (SHIRGAONKAR et al., 1998).

Embora o termo hidrólise se refira ao rompimento pela água, raramente a mesma atua sozinha. Geralmente os processos de hidrólise necessitam de condições de operação e catalisadores para atingir conversão total, destacando-se: temperatura, pressão, ácido, base ou enzimas (BARCZA, 2010).

De acordo com Harun et al. (2011), os pré-tratamentos ácido e alcalino são os que requerem menor custo operacional se comparados aos tratamentos enzimáticos. Os tratamentos ácidos são amplamente estudados e utilizados predominantemente em matérias-primas com elevados conteúdos de carboidratos e os tratamentos alcalinos são mais aplicados a matérias-primas com elevadas concentrações de proteína e vêm sendo recentemente aplicados às microalgas.

Parâmetros como a temperatura, a concentração de substrato e a adição de hidróxido de sódio foram avaliados como formas de pré-tratamento em um estudo de biomassa algal produzida em lagoas de tratamento de esgoto. Como resultado, foi possível observar um aumento de 33% na produção específica de metano, sob uma condição de pré-tratamento de 100°C por 8h (CHEN e OSWALD, 1998). Samson e LeDuy (1983) obtiveram resultados semelhantes sob condições de pré-tratamento de 150°C e pH 11. Keep et al. (2000) mostraram, para uma indústria em grande escala, que o tratamento térmico prévio é capaz de equilibrar-se energeticamente à produção de metano. No entanto, Yen e Brune (2007) e Sialve

et al. (2009) relatam que a quantidade de energia necessária para o pré-tratamento térmico é maior do que o ganho de energia a partir do aumento da produção de metano, mostrando-se, desta forma, não compensatório.

A observação da Figura 2.10 permite avaliar a eficiência da digestão metanogênica sem qualquer processo de pré-tratamento, assim como após a extração de lipídio para a produção de biodiesel (LAKANIEMI et al., 2013).

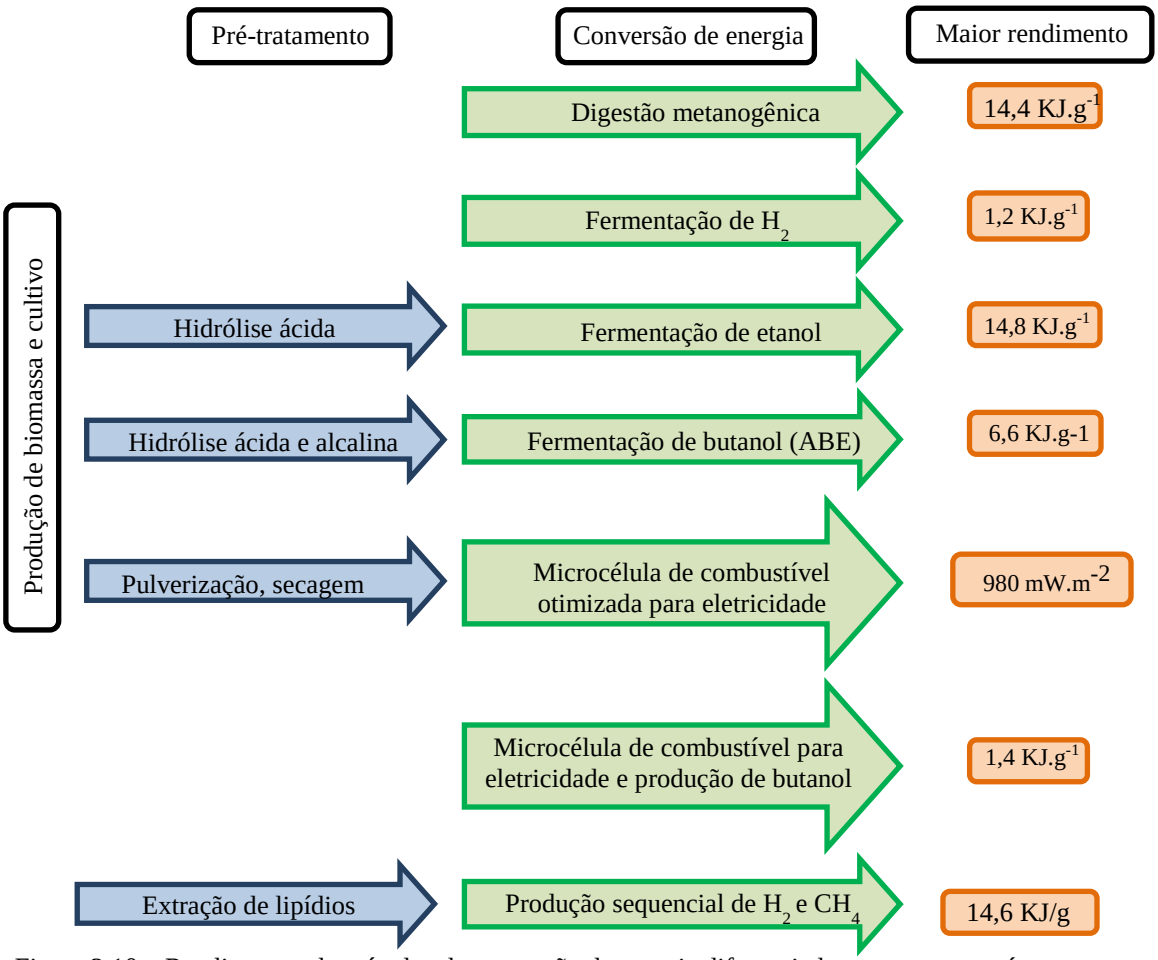

Figura 2.10 – Rendimentos de métodos de conversão de energia diferenciados, com e sem pré-tratamento (adaptado de Lakaniemi et al., 2013).

Valores máximos foram alcançados com a fermentação de etanol, após uma etapa de hidrólise ácida; entretanto, valores muito próximos foram atingidos sem qualquer tratamento prévio ou com tratamentos que visavam à obtenção de novos recursos (LAKANIEMI et al., 2013).

Zamalloa et al. (2011) relatam que no tratamento com filtro anaeróbio e biorreatores de membrana, onde ocorre uma alta retenção de sólidos, pode ocorrer o entupimento e consequente redução nas taxas de conversão volumétricas. As Tabelas 2.13 e 2.14 apresentam rendimentos da produção de hidrogênio e metano, respectivamente, de amostras pré-tratadas e inoculadas em diferentes reatores.

Tabela 2.13 – Produção de hidrogênio a partir de várias espécies de microalgas. (Fonte: adaptado de Lakaniemi et al., 2013).

Microalga	Pré-tratamento	Reator	Inóculo	Temperatura (°C)	Rendimento de H_2 (mL/g de microalga)	Referência
Chlamydomonas spp.	Nenhum	Tubo em batelada	Nenhum[a]	37	48	Miura et al. (1986)
Chlorella vulgaris	Nenhum	Garrafões em batelada	Composto	60	114	Carver et al. (2011)
Chlorella vulgaris	Nenhum	Garrafões em batelada	Nenhum[a]	37	11	Lakaniemi et al. (2011)
Dunaliella tertiolecta	Nenhum	Garrafões em batelada	Composto	60	58	Carver et al. (2011)
Scenedesmus spp.	Extração de lipídios e tratamento térmico alcalino (27°C, 24 h)	Garrafões em batelada	Lodo digerido anaerobiamente	37	17	Yang et al. (2011)
Scenedesmus spp.	Extração de lipídios e tratamento térmico alcalino (100°C, 8 h)	Garrafões em batelada	Lodo digerido anaerobiamente	37	46	Yang et al. (2011)

[a] A geração de hidrogênio foi atribuída à fermentação intracelular.

Tabela 2.14 – Produção de metano a partir de várias espécies de microalgas (Fonte: adaptado de Lakaniemi et al. (2013).

Inóculo	Pré-tratamento	Reator	Temperatura (°C)	Rendimento de CH_4 (mL/g de microalga)	Referência
Cianobactéria *Arthrospira maxima*[a]	Nenhum	Frascos digestores, operação contínua	35	360	Samson e LeDuy (1983)
Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*	Nenhum	Fermentador em batelada	38	387	Mussgnug et al. (2010)
Microalga *Chlorella* spp	Secagem e moagem	Garrafões em batelada	37	> 400	Ehimen et al. (2009)
Microalga *Dunaliella salina*	Nenhum	Fermentador em batelada	38	323	Mussgnug et al. (2010)
Microalga *Phaedactylum tricornutum*	Nenhum	Garrafões em batelada	33	350	Zamalloa et al. (2012)
Microalga *Scenedesmus* spp	Extração de lipídios e tratamento térmico alcalino (100°C, 8 h)	Garrafões em batelada	37	323	Yang et al. (2011)
Mistura de cultura de microalgas[b]	Tratamento térmico (70°C, 60 h)	Reator Plug Flow semi-contínuo	40	335	De Schamphelaire e Verstraete (2009)
Mistura de cultura de microalgas[c]	Nenhum	Batelada alimentada	45	402	Golueke e Oswald (1959)

[a] *Arthrospira* também é conhecida como *Spirulina;* [b] Sistema suplementado com *Chlamydomonas reinhardtii* e *Pseudokircheneriella subcapitada;* [c] *Chlorella, Scenedesmus, Euglena* e *Oscillatoris* spp.

Os dados apresentados nas Tabelas 2.13 e 2.14 mostram que os estudos existentes sobre produção de metano e/ou biohidrogênio a partir de biomassa de microalgas são preliminares, em escala de bancada e em regime de batelada. Portanto, não permitem concluir

sobre a viabilidade técnica e econômica do processo e a necessidade ou não de uma etapa de pré-tratamento anterior à digestão anaeróbia da biomassa.

Assim, é importante a continuidade dos estudos sobre a degradação anaeróbia de biomassa de microalgas, sobretudo devido aos diferentes resultados obtidos com diferentes espécies e condições de operação, tanto no cultivo das microalgas como na etapa de digestão anaeróbia. Neste trabalho avaliou-se a eficiência de métodos de pré-tratamento térmico e químico (ácido e base) para rompimento celular e disponibilização do conteúdo celular da microalga *Isochrysis galbana* e seu efeito sobre a produção de metano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau P.A. (pureza absoluta). As amostras utilizadas foram caracterizadas, conservadas a 4°C em refrigerador e deixadas para aclimatação até atingir temperatura ambiente no momento de sua utilização.

3.1 Biomassa de Microalga

Para o presente estudo foram conduzidos ensaios utilizando a biomassa de microalga *Isochrysis galbana* da coleção de microalgas do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), localizado no Instituto de Química/UFRJ. A manutenção e o cultivo da microalga foram realizados no laboratório H2CIN da Escola de Química da UFRJ, por alunos de pós-graduação que desenvolvem dissertações e teses de produção de microalgas visando à captura e reuso de CO_2. A seguir, o meio e as condições de cultivo são apresentados para esclarecer a origem da biomassa utilizada no presente estudo, e baseia-se no trabalho de PICARDO (2012).

3.1.1 Meio de cultivo

A microalga foi cultivada em meio f/2 modificado (GUILLARD, 1975), ou seja, sem a adição da solução de silicato, conforme discriminado na Tabela 3.1. A escolha do cultivo em meio f/2 deveu-se a sua ampla utilização no cultivo de microalgas marinhas. Para o cultivo foi utilizada água de mar sintética “Ocean Fish” enriquecida com nutrientes inorgânicos. Para o preparo da água do mar sintética, foram utilizados 35,0 g de sal marinho para cada 1L de água destilada. Para o preparo do meio de cultura a água foi autoclavada e posteriormente foi adicionado o sal. A solução salina e as soluções estoque de meio (exceto a solução de metais) foram filtradas em membrana de celulose de 0,22 μm de tamanho de poro e autoclavadas a 121°C e 1 atm por 30 minutos, exceto a solução de vitaminas que foi esterilizada por filtração em membranas de celulose de 0,22 μm de tamanho de poro em câmara de fluxo laminar, no intuito de evitar uma possível contaminação por bactérias e fungos. Em seguida, foram

adicionadas à água do mar sintética, as soluções de $NaNO_3$, NaH_2PO_4, traços de metais ($CoCl_2$, $CuSO_4$, $MnCl_2$, Na_2MoO_4, $ZnSO_4$) e vitaminas (tiamina, biotina e cianocobalamina).

Tabela 3.1 – Concentração das soluções adicionadas à água salina para preparo do meio f/2 (GUILLARD, 1975; PICARDO, 2012).

Macronutrientes	**Concentração final do meio f/2 (µM)**
$NaNO_3$	880,0
$NaH_2PO_4.H_2O$	36,2
Quelantes (µM)	
Ácido cítrico	21,40
Citrato férrico	13,45
Solução de metais traço (nM)	
$CoCl_2.6H_2O$	47
$CuSO_4.5H_2O$	40
$MnCl_2.4H_2O$	910
$NaMoO_4.2H_2O$	26
$ZnSO_4.7H_2O$	75
Vitaminas (nM)	
Tiamina (B1)	300
Biotina (H)	2
Cianocobalamina (B12)	0,4

3.1.2 Condições de cultivo

Um dos modelos de cultivo mais utilizados é o cultivo fotoautotrófico, que consiste no uso da luz (artificial ou natural) por microalgas como fonte de energia e dióxido de carbono para crescimento de biomassa e necessidades metabólicas (HUANG et al., 2010). Picardo (2012) relatou que para a microalga *Isochrysis galbana* o cultivo fotoautotrófico foi mais eficiente e apresentou menor custo de produção se comparado aos cultivos mixotróficos e heterotróficos.

Os cultivos foram realizados em batelada alimentada e ajustes de nitrogênio e fósforo foram realizados mediante a necessidade do cultivo (PICARDO, 2012). Os inóculos foram feitos em erlenmeyer de 3L e em garrafas de 8L de forma sequenciada, com o meio de cultura descrito anteriormente e mantidos sob iluminação de lâmpadas fluorescentes que geravam uma intensidade luminosa de 70 µmol fótons/m^2/s, com foto-períodos de iluminação com duração de 12h por dia. A temperatura era mantida entre 25 e 26°C e a aeração foi estabelecida com o auxílio de bombas de aquário e cilindros de ar comprimido. A aeração provê a mistura do sistema, evitando o depósito de células em regiões de baixa luminosidade (MOLINA GRIMA et al., 2001).

Camiro-Vargas et al. (2005) verificaram que a aeração apenas com mistura atmosférica não foi suficiente para atingir níveis ótimos de crescimento da microalga *Isochrysis galbana*, assim foi implementada a injeção de CO_2 no intuito de acelerar o desenvolvimento. Desta forma, os cultivos foram supridos com CO_2 a 5% (v/v).

Cultivos em reator com capacidade de 2L também foram realizados, de acordo com a metodologia acima descrita, entretanto o controle era mais rigoroso em função da automatização do sistema.

Após atingir a fase estacionária o cultivo era interrompido e a biomassa de algas era centrifugada em centrífuga refrigerada (CIENTEC, modelo CT6000R) a 4000 rpm e aproximadamente 20°C durante 10 minutos. O concentrado era ressuspendido em água destilada e caracterizado em termos de pH, Sólidos, DQO, DBO_5, Carbono, Nitrogênio, Fósforo, Óleos e Graxas, carboidratos e proteínas, de acordo com as metodologias descritas no item 3.8.1.

3.2 Lodo anaeróbio

O lodo utilizado como consórcio microbiano neste trabalho é oriundo de biorreator anaeróbio do tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) em operação em indústria de abate de aves e não foi adaptado à biomassa de algas. Sua caracterização consistiu na quantificação do teor de sólidos voláteis totais presentes na amostra, que foi de 11.000 mg/L.

3.3 Pré-tratamento com agitação mecânica

Visando operação industrial, o custo operacional é geralmente minimizado com a redução de insumos químicos. Portanto, para aumentar a biodegradabilidade da biomassa de algas sem onerar muito o custo do processo, foi realizado um pré-tratamento mecânico da biomassa úmida antes da etapa de hidrólise (NEVES, 2003). Assim, foram realizados ensaios variando-se a massa de pérolas de vidro (g) e o tempo de agitação (minutos), para estabelecer a relação ótima para pré-tratar a amostra, conforme a Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Ensaio de pré-tratamento mecânico.

Pérolas de vidro (g)	Tempo (min)
1	1
1	3
1	5
3	1
3	3
3	5
5	1
5	3
5	5

Alíquotas de 5 mL da suspensão aquosa de biomassa de algas eram colocadas em tubos de ensaio com pérolas de vidro apresentando tamanho médio de 3 mm, de acordo com as especificações da Tabela 3.2, e submetidos a agitação em vortex. Após o ensaio, as amostras eram peneiradas para retenção das pérolas de vidro e uma análise da Demanda Química de Oxigênio solúvel (DQOs) era feita para verificar a eficiência do pré-tratamento com base no aumento da DQOs.

Após a definição da relação ótima de massa de pérolas de vidro (g) : tempo (min) iniciaram-se os ensaios de hidrólise. Para a hidrólise, os volumes utilizados foram maiores, entretanto as amostras foram igualmente pré-tratadas respeitando-se a proporção de massa de pérolas de vidro (g): tempo (min): volume de biomassa (mL) de 1:1:5.

3.4 Hidrólise térmica e ácida de biomassa de algas

3.4.1 Efeito da temperatura, pressão e concentração de ácido

Foram testadas diferentes condições de hidrólise, tomando como base os trabalhos realizados por Yawson et al. (2011) e Ho et al. (2012). As variáveis de operação estudadas foram: temperatura, pressão, concentração de ácido sulfúrico (% v/v) e tempo de reação. Para os ensaios conduzidos a pressão atmosférica, tubos de ensaio de 10 mL eram preenchidos com 5 mL da suspensão de biomassa de algas e ácido sulfúrico, variando-se a concentração de 0% a 2% (v/v) a temperaturas de 60°C, 150°C e 121°C. A temperatura foi controlada com a utilização de um banho termostatizado (Memmert) em 60,0±0,1°C e com o auxílio de um digestor (Hach) em 150°C e neste caso os ensaios foram realizados sob pressão de 1 atm. Já para os ensaios conduzidos a pressão relativa de 2 atm e 121°C, com o auxílio de autoclave, empregou-se 100 mL da suspensão de biomasssa de algas em frasco de vidro de 250 mL

autoclavável e de tampa rosqueável. Foram assumidos tempos de hidrólise de 20, 40 e 60 minutos.

Os experimentos foram conduzidos com uma suspensão de biomassa caracterizada em termos de DQO total (3564 mg/L), solúvel (620 mg/L) e particulada (2944 mg/L) e os resultados foram analisados com base no aumento da DQOs da amostra, de acordo com a metodologia ilustrada na Figura 3.1.

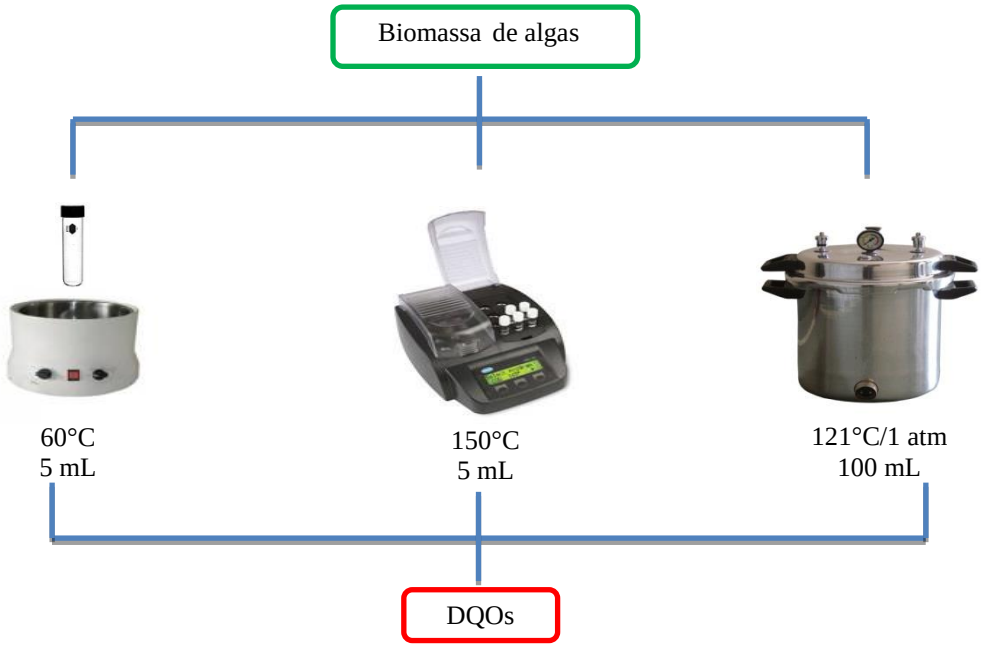

Figura 3.1 – Esquema de hidrólise da biomassa de microalgas

3.4.2 Efeito da concentração inicial de biomassa

Reproduziram-se as mesmas condições ilustradas na Figura 3.1 para diferentes valores iniciais de DQO no intuito de verificar a influência da concentração de material particulado na hidrólise. Os novos valores de DQO estudados são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Valores de DQO nos ensaios de hidrólise.

DQO total (mg/L)	DQO solúvel (mg/L)	DQO particulada (mg/L)
1905	208	1697
4781	327	4454

*Valores médios em triplicata

3.5 Hidrólise térmica e alcalina da biomassa de algas

Foram testadas diferentes condições de hidrólise, tomando como base os trabalhos realizados por Yawson et al. (2011), Harun et al. (2011) e Ho et al. (2012). Utilizou-se a metodologia anteriormente citada para a hidrólise ácida, substituindo-se o ácido sulfúrico por hidróxido de sódio, variando-se sua concentração de 0% a 1% (m/v). Os resultados foram novamente analisados com base no aumento da DQOs da amostra.

A partir dos resultados de hidrólise térmica ácida, optou-se por fazer um planejamento experimental, usando o programa Statistica 7.0 (Statsoft).

3.6 Planejamento experimental

No presente estudo foram realizados planejamentos experimentais para hidrólise ácida e alcalina. Para otimizar a investigação sobre as condições de hidrólise, realizou-se um planejamento estatístico fatorial de ordem 2^3 com ponto central. Este planejamento fatorial com ponto central foi escolhido porque permite avaliar a curvatura do plano, visualizando a região de melhores resultados, além da redução do número de experimentos em comparação com a realização do mesmo planejamento com réplicas em todos os pontos.

Além disso, o fato de existirem pontos centrais nos permite reprodutibilidade, além da realização do teste t, cálculo de p e F, uma vez que pode ser determinado um grau de liberdade. Caso não houvesse réplica nem pontos centrais, tais parâmetros não poderiam ser calculados, prejudicando a análise estatística dos dados. Sendo necessária, desta forma, a inferência de réplicas. O planejamento estatístico resultou em 8 experimentos e 3 pontos centrais.

Os resultados de análise de variância foram analisados com o programa Statistica 7 (StatSoft), seguindo os critérios de significância presentes na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Interpretações para os valores p obtidos nos testes de hipóteses (Fonte: CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Valores de p	**Significado**
$p < 0,01$	Grande importância do ponto de vista estatístico
$0,01 < p < 0,05$	Importante do ponto de vista estatístico
$p > 0,05$	Pouco importante do ponto de vista estatístico

3.6.1 Planejamento experimental – Hidrólise ácida

Para a hidrólise ácida foram realizados dois planejamentos experimentais. Para o primeiro planejamento experimental (planejamento A) foi fixado um tempo de hidrólise de 2 h. Já para o segundo planejamento experimental (planejamento B), as amostras foram pré-tratadas mecanicamente e o tempo de hidrólise considerado foi 16 h, tempo que proporcionou o melhor resultado. Para ambos os casos as variáveis foram as mesmas, entretanto apresentaram diferenças nos valores de temperatura e concentração de ácido (Tabelas 3.5 e 3.6).

Tabela 3.5 – Níveis das variáveis independentes do planejamento A (2 h).

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
DQO particulada (mg/L)	1500	3000	4500
Temperatura (°C)	50	100	150
Ácido (% v/v)	0	0,5	1

Tabela 3.6 – Níveis das variáveis independentes do planejamento B (amostra pré-tratada, 16 h).

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
DQO particulada (mg/L)	1500	3000	4500
Temperatura (°C)	40	50	60
Ácido (% v/v)	0	0,1	0,2

3.6.2 Planejamento experimental – Hidrólise alcalina

Para a hidrólise alcalina foram realizados dois planejamentos experimentais (planejamentos C e D), seguindo os mesmos parâmetros usados nos planejamentos experimentais da hidrólise ácida. No entanto, ao invés do ácido sulfúrico, foi utilizado hidróxido de sódio (NaOH), e tempos de reação de 2 e 16 h (resultante de ensaios preliminares), conforme descrito nas Tabelas 3.7 e 3.8.

Tabela 3.7 – Níveis das variáveis independentes do planejamento C (2h)

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
DQO particulada (mg/L)	1500	3000	4500
Temperatura (°C)	50	100	150
NaOH (% m/v)	0	0,5	1

Tabela 3.8 – Níveis das variáveis independentes do planejamento D (amostra pré-tratada, 16 h).

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
DQO particulada (mg/L)	1500	3000	4500
Temperatura (°C)	40	50	60
NaOH (% m/v)	0	0,1	0,2

3.7 Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia

Após os ensaios de hidrólise, a biomassa de microalgas já hidrolisada tinha o pH ajustado para 7,0 ± 0,2 com $NaHCO_3$ (na hidrólise ácida) e era inoculada junto com o lodo em frascos tipo penicilina de 100 mL, com volume útil de 90 mL (utilizou-se 10 mL de *headspace*), lacrados com batoques de borracha e lacres de alumínio para a manutenção de um ambiente anaeróbio no interior dos frascos. Para que a produção de biogás fosse verificada ao longo do tempo, agulhas de seringas plásticas de 20 mL eram acopladas no selo de borracha (Figura 3.2). À medida que o biogás era produzido, o êmbolo era deslocado e o volume de biogás medido.

Figura 3.2 – Frascos tipo penicilina em ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.

O inóculo foi realizado mantendo-se proporções de Sólidos Voláteis Totais do lodo: DQO da biomassa igual a 1:1, e a suplementação com soluções de macro e micronutrientes (Tabela 3.9) foi realizada de acordo com a necessidade estequiométrica da amostra, seguindo a relação DQO:N:P de 350:5:1, de acordo com Chernicharo (2007). Após o inóculo, os frascos eram mantidos em uma sala climatizada a 30 ± 2 ºC, pois de acordo com Samson e Le Duy (1986) temperaturas mesofílicas são mais favoráveis para a degradação da matéria orgânica. A incubação era mantida até estabilização da produção de biogás. Após a estabilização da produção de biogás, o gás presente nas seringas era transferido para ampolas gasométricas e submetido à análise de cromatografia gasosa.

Objetivando verificar o comportamento do lodo adaptado à biomassa de microalgas e a produção de gás decorrente deste processo, foram realizados três contatos subsequentes, respeitando-se a proporção DQO: SSV (1:1). Após a abertura dos frascos no primeiro contato, o sobrenadante era retirado, tomando-se cuidado para não haver perda de lodo, e uma nova alimentação era introduzida para avaliação de um segundo período de contato. O mesmo procedimento foi adotado para um terceiro contato.

Nos ensaios com biomassa pré-lavada, a suspensão de biomassa era ressuspensa, após a primeira centrifugação, em água destilada e novamente centrifugada por três vezes seguidas.

Tabela 3.9 – Solução de Macro e Micronutrientes (Fonte: CHERNICHARO, 2007).

Solução	Nutriente	Concentração (mg/L)	Finalidade
1	$NaHCO_3$	1000	Fonte de alcalinidade
	KH_2PO_4	650	Macronutriente e fonte de alcalinidade
	K_2HPO_4	150	Macronutriente e fonte de alcalinidade
	NH_4Cl	500	Macronutriente
	$MgCl_2$	100	Macronutriente
	$CaCl_2.2H_2O$	100	Macronutriente
	$Na_2S.7H_2O$	50	Agente redutor
	Extrato de levedura	50	Fonte de vitaminas
2	$FeCl_3.6H_2O$	2	Micronutrientes
	$ZnCl_2$	0,05	
	$CuCl_2.2H_2O$	0,03	
	$MnCl_2.4H_2O$	0,5	
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0,05	
	$AlCl_3.6H_2O$	0,05	
	$CoCl_2.6H_2O$	2	
	$NiCl_2.6H_2O$	0,05	
	H_3BO_3	0,01	

* No momento da utilização das soluções foi adicionado 1mL da solução 2 por litro da solução 1, perfazendo uma solução única a ser adicionada nos frascos.

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Caracterização da biomassa e lodo, monitoramento dos ensaios

A caracterização da biomassa em suspensão e do lodo, assim como o monitoramento de todos os ensaios, foram realizados com métodos físico-químicos conduzidos sob condições padrão, de acordo com o Standard Methods (Tabela 3.10 - APHA, 2005). A determinação de

carboidratos e proteínas foi conduzida empregando-se os métodos de Dubois et al. (1956) e Lowry et al. (1951), descritos a seguir.

Tabela 3.10 – Metodologia de análises (Fonte: APHA, 2005).

Parâmetro	Metodologia
pH	4500-H+B
Temperatura	2550-B
DQO	5220 D
DBO_5	5210-B
Carbono	5310-B
Nitrogênio	4500-N B
Fosfato	4500-P C
Amônia	4500-NH_3 D
Sólidos	2540-B, D, E
O & G	5520-D

3.8.2 Determinação da composição do biogás

A composição do biogás foi medida em um cromatógrafo Micro CG VARIAN (CP-4900), empregando-se uma coluna PPQ 10 m × 0,32 mm, com temperatura de coluna de 50°C, detector de condutividade térmica (TCD) de 250°C, injetor de temperatura de 80°C e gás hélio como gás de arraste (DAMASCENO, 2012).

3.8.3 Determinação de carboidratos

A quantificação de carboidratos na fase aquosa e na suspensão de biomassa era feita diretamente, pipetando-se 1 mL de amostra e continuando a análise conforme supracitado. Para a quantificação de carboidrato na fase solúvel, a suspensão era filtrada em membrana de tamanho de poro 0,45 µm.

Para a determinação de carboidratos foi empregado o método de Dubois et al. (1956). Nesta metodologia prepara-se, para a curva de calibração, uma solução padrão de glicose a 1g/100 mL a qual é armazenada a 4°C. Para a reação coloca-se 1 mL de amostra e 1 mL de solução de fenol 5% (m/v), em seguida adiciona-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como a reação é exotérmica, aguarda-se que a amostra chegue à temperatura ambiente e lê-se a absorbância em espectrofotômetro a 490 nm.

3.8.4 Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas na fase aquosa era feita diretamente, pipetando-se 0,4 mL de amostra após filtração em membrana de tamanho de poro de 0,45 µm e continuando a análise conforme supracitado. Já a quantificação de proteínas na biomassa era feita após uma etapa de digestão da biomassa, conduzida acrescentando-se 1 mL de NAOH 1N a 5 mL de amostra em banho-maria a 100ºC por 10 min.

Para a determinação de proteínas foi empregado o método de Lowry et al. (1951). Nesta metodologia prepara-se, para a curva de calibração, uma solução padrão de albumina de soro bovino a 1 mg/mL a qual é armazenada a 4°C. Para a reação coloca-se 0,4 mL de amostra e 2 mL de solução de tartarato de sódio e potássio em conjunto com sulfato de cobre, agita-se a amostra com o auxílio de um vortex e aguarda-se 10 minutos. Em seguida, adiciona-se 0,2 mL do reagente folin-ciocalteau diluído em água (1:1), a amostra é homogeneizada com o auxílio de um vortex e mantida no escuro por 30 minutos. Após este período a absorbância da amostra é lida em espectrofotômetro a 750 nm.

Após a digestão, a amostra era diluída e 0,4mL do digerido era pipetado e misturado a 2 mL da solução de tartarato de sódio e potássio (preparada com água destilada ao invés de NaOH) em conjunto com sulfato de cobre, seguindo-se o mesmo procedimento empregado para a proteína em fase aquosa.

3.8.5 Determinação de cloretos

A determinação de cloretos foi realizada de acordo com o Standard Methods (APHA, 2005). Nesta metodologia utiliza-se um volume de amostra de 50 mL, ao qual é adicionado 1 mL do indicador cromato de potássio. Em seguida, a amostra é homogeneizada e titulada com uma solução de nitrato de prata a 0,0141 N até o ponto de equivalência. Para o branco, o mesmo procedimento foi adotado, sendo substituída a amostra pelo mesmo volume de água. O volume titulado é anotado e a concentração de cloreto é determinada com base no cálculo da Equação 5:

$$\frac{\text{mg}}{\text{L}}\,\text{Cl}^- = \frac{(\text{A}-\text{B})\text{N x } 35.450}{\text{mL de amostra}} \qquad (5)$$

Onde, A é o volume pipetado na amostra e B é o volume pipetado no ensaio controle.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da suspensão de biomassa de microalgas

A Tabela 4.1 apresenta os resultados da caracterização da suspensão da biomassa de microalgas cedida pelo Laboratório H_2CIN, produzida segundo os critérios e análises citados na metodologia.

Tabela 4.1 – Caracterização da suspensão de biomassa da microalga *Isochrysis galbana*.

Parâmetros	Valores medidos	Percentual (%)
pH	7,4	--
Sólidos totais	45133 mg/L	--
Sólidos voláteis totais	11112 mg/L	25
DQO total	3564 mg/L	--
DQO solúvel	620 mg/L	17,4
DBO_5	686 mg/L	--
DQO/DBO_5	5,2	--
Carbono total	1037,1 mg/L	--
Carbono inorgânico	147,0 mg/L	--
Carbono orgânico total	890,1 mg/L	--
Nitrogênio total	205 mg/L	--
Fósforo solúvel	2,6 mg/L	--
Óleos e graxas	2533 mg/L	22,8
Carboidratos (eq. glicose)	718 mg/L	6,5
Proteínas	1700 mg/L	15,3

A suspensão apresentou pH próximo da neutralidade, favorável à condução da digestão anaeróbia sem necessidade de ajustes. A baixa proporção de sólidos voláteis totais em relação aos sólidos totais (cerca de 25%), indica a presença de sais empregados no meio de cultivo, mesmo após a centrifugação e descarte do meio de cultivo sobrenadante. Parte destes sais está na forma de carbonatos e bicarbonatos, conforme mostram os valores de Carbono Inorgânico. Os valores bem menores de DQO total, em comparação aos sólidos totais, também comprovam uma salinidade residual. Esta salinidade pode inibir a atividade dos micro-organismos anaeróbios, sendo necessária uma adaptação gradual dos micro-organismos (CHEN et al., 2008).

A suspensão de biomassa apresentou-se com baixa DQO solúvel (somente 17,4% da DQO total) e pouco biodegradável, devido à relação DQO/DBO_5 estar acima de 5 (VON SPERLING, 2011), denotando a necessidade de uma etapa de tratamento físico-químico preliminar ao tratamento biológico. A relação DQO_{total}: N: P (1370:79:1) obtida para a suspensão denota, com base na relação ideal de 350:5:1 (CHERNICHARO, 2007), quantidades suficientes de nitrogênio, mas baixas concentrações de fósforo solúvel, sendo este último suplementado para atingir valores satisfatórios nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

Observou-se uma elevada concentração de óleos e graxas (O&G), o que pode prejudicar a condução da digestão anaeróbia (CHEN et al., 2008). Este elevado valor decorre da biomassa ter sido cultivada sob condições que propiciam o acúmulo de lipídios e ter sido fornecida a fresco, antes da etapa de extração dos lipídios para a produção de biodiesel. Outra hipótese consiste na extração de outros compostos orgânicos, como por exemplo, o pigmento fotossintético denominado clorofila, capaz de ser extraído por sua afinidade com o solvente utilizado, hexano (FEEMA, 1983; APHA, 2005). Segundo Mata et al. (2010), a concentração de lipídeos de *Isochrysis galbana* seria de 7- 40% (em peso seco de biomassa). Os dados obtidos indicam um percentual de 22,8% (considerando que os SVT quantificam praticamente a biomassa suspensa), podendo-se assim descartar uma interferência significativa na metodologia de quantificação de óleos e graxas.

O valor obtido em termos percentuais (6,5%), este é bem inferior aos citados por outros autores. Campos et al. (2010), por exemplo, citam 18,6% de carboidratos na biomassa de *Isochrysis galbana*, enquanto Tokusoglu e Unal (2003) citam 16,98% para a biomassa de *Isochrysis*.

A concentração de proteína também apresentou valor percentual (15,3%) menor que os relatados na literatura. Campos et al. (2010), por exemplo, citam 29,4% de proteínas na biomassa de *Isochrysis galbana*, enquanto Tokusoglu e Unal (2003) citam 26,99% para a biomassa de *Isochrysis*.

O conhecimento da composição celular em termos de proteínas, carboidratos e lipídios é importante na digestão anaeróbia, tendo em vista que estes constituintes apresentam diferentes potenciais de produção de metano. Mata et al. (2010) citam que proteínas, carboidratos e lipídios apresentam potencial de produção de metano crescente, nesta ordem. No entanto, Habig (1985) avaliou diversas condições nas quais carboidratos e proteínas intracelulares combinados não exerceram papel significativo na produção de biogás; no entanto, ao avaliar isoladamente cada constituinte celular, observou que carboidratos e

proteínas são os componentes que exercem maior contribuição positiva no rendimento de biogás. Além disso, constatou que carboidratos solúveis são os componentes mais importantes na determinação do rendimento de biogás e que experimentos conduzidos com algas após extração de proteínas apresentaram menor tempo de digestão e maior produção de biogás quando comparados ao processo de digestão com biomassa bruta.

Cabe ressaltar que os percentuais dos constituintes celulares variam de acordo com as condições de cultivo das microalgas, assim como as condições de produção de metano nos experimentos conduzidos por diferentes autores.

Mediante a constatação da necessidade de aumentar a biodegradabilidade da biomassa de microalgas, foi realizado um pré-tratamento mecânico antes da etapa de hidrólise.

4.2. Pré-tratamento com agitação mecânica

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 4.2 é possível observar que as melhores condições de solubilização da biomassa, medida pelo aumento percentual de DQO solúvel, foram obtidas com um grama de pérola de vidro por um ou cinco minutos. Entretanto, em virtude da pequena diferença existente entre estas duas condições, adotou-se a condição de um grama de pérola de vidro por um minuto nos experimentos subsequentes. Observou-se que os resultados não apresentam um padrão característico, sugerindo que os resultados não seguem uma relação cinética, por isso nota-se uma grande flutuação nos resultados.

Tabela 4.2 – Solubilização de DQO no pré-tratamento com pérolas de vidro.

Pérolas de vidro (g)	Tempo (min)	Δ DQOs (%)
1	1	61,73
1	3	37,86
1	5	62,96
3	1	32,51
3	3	0,82
3	5	-21,81
5	1	-37,45
5	3	34,98
5	5	24,69

4.3. Hidrólise térmica e ácida da biomassa de algas

4.3.1 Efeito da temperatura, pressão e concentração de ácido

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de diferentes condições de hidrólise empregadas, verificados através do aumento nos valores de DQO solúvel.

Tabela 4.3 – Resultados da hidrólise para DQO particulada inicial de 2944 mg/L (DQO solúvel inicial de 620 mg/L) sob diferentes concentrações de ácido, pressão, temperatura e tempo.

Condição					
Temperatura (^oC)	**Tempo (min)**	**Ácido % (v/v)**	**DQOs final (mg/L)**	**ΔDQOs (mg/L)[a]**	**% DQO Solubilizada[b]**
Autoclave (121)	20	0	1245	625	21,2
		0,5	1708	1088	37,0
		1,0	1871	1251	42,5
		2,0	2093	1473	50,0
60	20	0	794	174	5,9
		0,5	403	-217	0,0
		1,0	668	48	1,6
		2,0	418	-202	0,0
	40	0	869	249	8,5
		0,5	690	70	2,4
		1,0	651	31	1,1
		2,0	746	126	4,3
	60	0	1663	1043	35,4
		0,5	640	20	0,7
		1,0	2935	2315	78,6
		2,0	1127	507	17,2
150	20	0	841	221	7,5
		0,5	1177	557	18,9
		1,0	1273	653	22,2
		2,0	1453	833	28,3
	40	0	983	363	12,3
		0,5	1503	883	30,0
		1,0	1223	603	20,5
		2,0	1520	900	30,6
	60	0	1278	658	22,4
		0,5	1232	612	20,8
		1,0	1600	980	33,3
		2,0	1448	828	28,1

*Valores médios em triplicata, [a] ΔDQOs = DQOs final – DQOs inicial, [b] % DQO solubilizada = (ΔDQOs / DQO inicial particulada)*100.

Foram obtidos percentuais de solubilização da DQO particulada de 0 a 78,6%, indicando que as variáveis estudadas têm influência sobre a solubilização da matéria orgânica particulada (biomassa). Na condição de 1atm/121ºC por 20 min (autoclave), a solubilização aumentou proporcionalmente com a concentração de ácido, chegando a 50,0% com 2% (v/v) de ácido. Já na temperatura de 60ºC, a solubilização não tem relação com a concentração de ácido, mas com o tempo de hidrólise. Em 20 min a solubilização é insignificante, atingindo uma solubilização média (considerando todas as concentrações de ácido) de 1,9%; em 40 min a média é de 4,1% e em 60 min de 33,0%, atingindo-se nesta última condição (60ºC, 60 min, 1% ácido) o maior valor obtido no ensaio – 78,6% de solubilização. Na condição de 150ºC, a concentração de ácido só tem influência sobre a solubilização no menor tempo de hidrólise (20 min), observando-se um aumento da mesma com a concentração de ácido neste tempo. Nos demais tempos, não há relação entre a concentração de ácido e a solubilização. Com relação ao tempo, também não se observou uma influência significativa sobre a solubilização, sendo obtidas solubilizações médias de 19,2%, 23,4% e 26,2% para os tempos de 20, 40 e 60 min, respectivamente.

O valor negativo para a diferença na DQOs, após a hidrólise, pode ter sido encontrado devido à condição de hidrólise apresentar um meio reacional muito agressivo por um tempo elevado. Tal condição pode ter resultado na hidrólise, seguida de degradação, da matéria orgânica solubilizada nos minutos iniciais da reação. E a grande variação nos resultados, pode estar atribuído ao comportamento não cinético demonstrado nos ensaios.

4.3.2 Efeito da concentração inicial de biomassa

No intuito de verificar se a concentração inicial de biomassa (medida como DQO particulada) tinha influência sobre os resultados, as mesmas variáveis foram avaliadas para distintos valores de DQO particulada. As Tabelas 4.4 e 4.5 apresentam os resultados obtidos para os diferentes valores de DQO particulada empregados nos ensaios, verificados através do aumento nos valores da DQO solúvel final.

Tabela 4.4 – Resultados da hidrólise para DQO particulada inicial de 1697 mg/L (DQO solúvel inicial de 208 mg/L) sob diferentes concentrações de ácido, temperatura, pressão e tempo.

Condição					
Temperatura (ºC)	**Tempo (min)**	**% Ácido (v/v)**	**DQOs Final (mg/L)**	**ΔDQOs (mg/L)[a]**	**% DQO solubilizada[b]**
Autoclave (121)	20	0	241	33	1,9
		0,5	430	222	13,1
		1,0	510	302	17,8
		2,0	471	263	15,5
60	20	0	76	-132	0,0
		0,5	60	-148	0,0
		1,0	0	-208	0,0
		2,0	185	-23	0,0
	40	0	226	18	1,1
		0,5	267	59	3,5
		1,0	178	-30	0,0
		2,0	215	7	0,4
	60	0	578	370	21,8
		0,5	0	-208	0,0
		1,0	267	59	3,5
		2,0	1232	1024	60,3
150	20	0	307	99	5,8
		0,5	388	180	10,6
		1,0	393	185	10,9
		2,0	450	242	14,3
	40	0	250	42	2,5
		0,5	0	-208	0,0
		1,0	451	243	14,3
		2,0	547	339	20,0
	60	0	245	37	2,2
		0,5	415	207	12,2
		1,0	392	184	10,8
		2,0	657	449	26,5

*Valores médios em triplicata, [a] ΔDQOs = DQOs final – DQOs inicial, [b] % DQO solubilizada = (ΔDQOs / DQO inicial particulada)*100.

Tabela 4.5 – Resultados da hidrólise para DQO particulada inicial de 4454 mg/L (DQO solúvel inicial de 327 mg/L) para diferentes concentrações de ácido, temperatura, pressão e tempo.

Condição					
Temperatura (ºC)	**Tempo (min)**	**% Ácido**	**DQOs Final (mg/L)**	**ΔDQOs (mg/L)[a]**	**% DQO solubilizada[b]**
Autoclave (121)	20	0	252	-75	0
		0,5	954	627	14,1
		1,0	904	577	13,0
		2,0	920	593	13,3
60	20	0	365	38	0,9
		0,5	269	-58	0
		1,0	292	-35	0
		2,0	70	-257	0
	40	0	285	-42	0
		0,5	376	49	1,1
		1,0	294	-33	0
		2,0	237	-90	0
	60	0	185	-142	0
		0,5	355	28	0,6
		1,0	217	-110	0
		2,0	285	-42	0
150	20	0	350	23	0,5
		0,5	648	321	7,2
		1,0	556	229	5,1
		2,0	684	357	8,0
	40	0	246	-81	0
		0,5	824	497	11,2
		1,0	994	667	15,0
		2,0	1231	904	20,3
	60	0	294	-33	0
		0,5	1786	1459	32,8
		1,0	932	605	13,6
		2,0	804	477	10,7

*Valores médios em triplicata, [a] ΔDQOs = DQOs final – DQOs inicial, [b] % DQO solubilizada = (ΔDQOs / DQO inicial particulada)*100.

Com a DQO particulada de 1697 mg/L, ainda são válidas as mesmas relações observadas para a DQO particulada de 2944 mg/L. Na condição de 1atm/121ºC por 20 min (autoclave), a solubilização aumentou proporcionalmente com a concentração de ácido, chegando a 17,8% com 1% (v/v) de ácido. Já na temperatura de 60ºC, a solubilização não tem relação com a concentração de ácido, mas com o tempo de hidrólise. Em 20 min a solubilização é nula; em 40 min a média é de 1,3% e em 60 min de 21,4%, atingindo-se nesta última condição (60ºC, 60 min, 2% ácido) o maior valor obtido no ensaio – 60,3% de solubilização. Na condição de 150ºC, a concentração de ácido só tem influência sobre a solubilização no menor tempo de hidrólise (20 min), observando-se um aumento da mesma com a concentração de ácido neste tempo. Nos demais tempos, não há relação entre a concentração de ácido e a solubilização. Com relação ao tempo, também não se observou uma influência significativa sobre a solubilização, sendo obtidas solubilizações médias de 10,4%, 9,2% e 12,9% para os tempos de 20, 40 e 60 min, respectivamente.

Já para a DQO particulada de 4454 mg/L, à exceção da condição de 150ºC, a hidrólise apresentou solubilizações da DQO particulada nulas ou muito baixas. Nesta condição, a solubilização foi muito baixa, mas verificou-se uma pequena influência do tempo, sendo obtidas solubilizações médias de 5,2%, 11,6% e 14,3% para os tempos de 20, 40 e 60 min, respectivamente.

A seguir, nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, é possível observar a representação gráfica dos resultados apresentados em cada uma das tabelas anteriores.

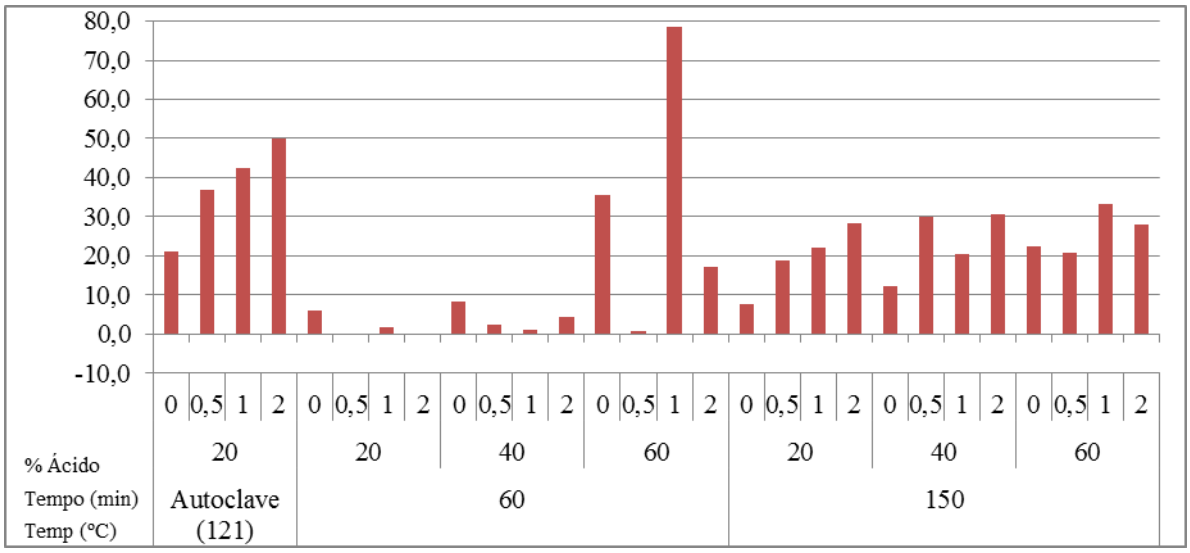

Figura 4.1 – Percentual de solubilização da DQO particulada inicial de 2944 mg/L sob diferentes condições.

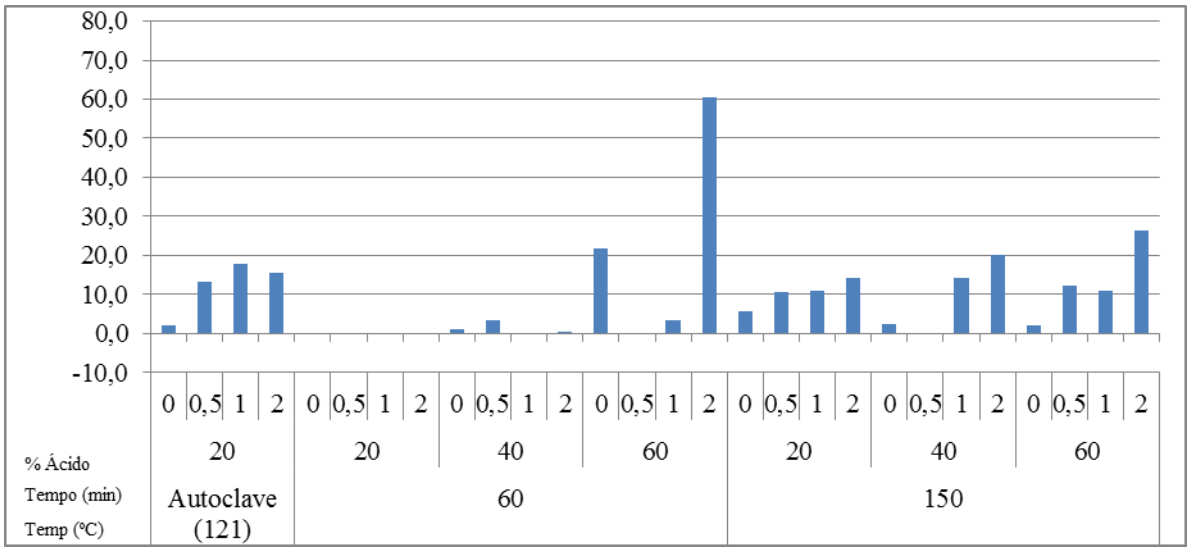

Figura 4.2 – Percentual de solubilização da DQO particulada inicial de 1697 mg/L sob diferentes condições.

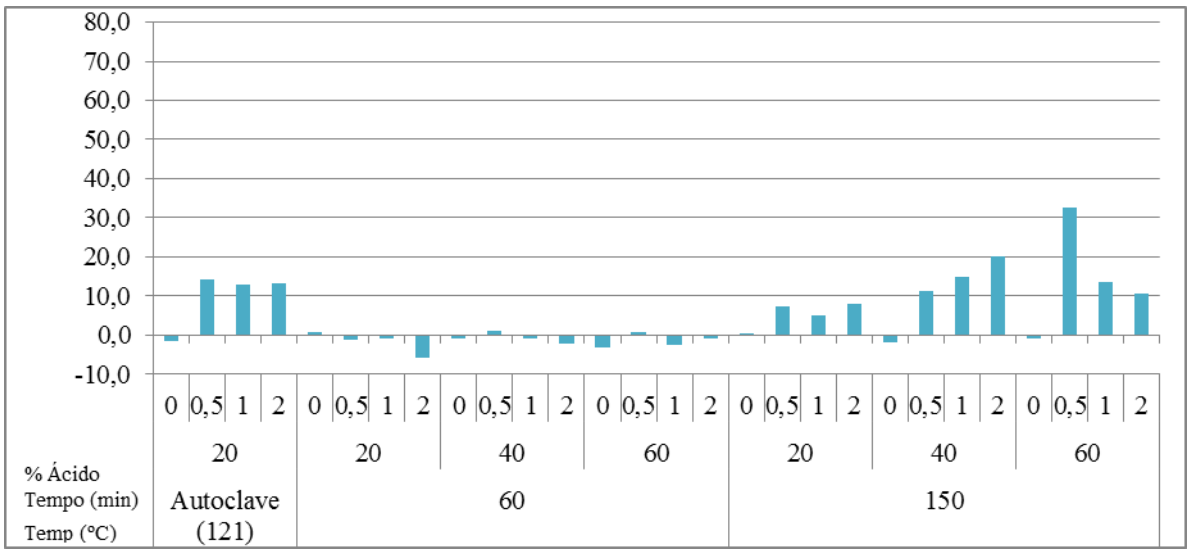

Figura 4.3 – Percentual de solubilização da DQO particulada inicial de 4454 mg/L sob diferentes condições.

Analisando-se os resultados alcançados em função da DQOs observou-se que a menor concentração de DQOp (1697 mg/L) apresentou os menores aumentos na DQOs final, com melhores resultados a 60°C por 60 min e com 2% de ácido. Ao passo que para a DQOp de 2944 mg/L, a 60°C por 60 min e com apenas 1% de ácido alcançou-se resultados superiores aos anteriores. A condição de autoclave apresentou resultados satisfatórios melhores para a concentração de 2944 mg/L do que para 1697 mg/L. Ambas as condições de DQOp citadas apresentaram um padrão de resposta proporcional ao aumento da DQOp.

A maior concentração de DQOp indicou que os melhores resultados são alcançados na temperatura de 150°C a partir de 40 min, sugerindo um novo patamar de temperatura a ser adotado, distinto das condições de DQOp anteriores - que indicavam 60°C; extrapolando-se

este conceito, é possível deduzir que elevadas concentrações de DQOp indicariam maiores temperaturas, inviabilizando o processo em escala industrial, devido ao custo operacional.

Assim, os resultados sugerem que existe uma relação ótima entre DQOp e a concentração de ácido, com a primeira se situando em torno de 3000 mg/L e a segunda entre 0,5 e 2%. Além disso, observou-se pelos resultados apresentados que a associação da variável pressão às demais, tal como demonstrado no ensaio com o uso de autoclave, não apresentou aumento na DQOs de forma significativa em comparação às demais condições sem o uso de pressão.

Como o objetivo da pesquisa é identificar uma boa condição de hidrólise para o tratamento da suspensão de microalgas em escala piloto e industrial, as condições que utilizaram autoclave e elevado teor de ácido (2%) foram descartadas. Nestas condições, apesar da elevada temperatura, pressão e acidez, houve uma solubilização de no máximo 50% da DQO inicial. Tais resultados, associados ao ônus decorrente de processos envolvendo pressão, levaram à retirada da variável pressão nos ensaios posteriores.

Resultados de ensaios preliminares indicaram condições brandas de temperatura e concentração de ácido como as melhores condições de trabalho. Tal fato estimulou novas pesquisas em uma faixa de temperatura mais ampla (50°C, 100°C e 150°C) e percentuais mais baixos de ácido (0%, 0,5% e 1%). Como nos ensaios preliminares o tempo apresentou influência sobre a solubilização de DQO, decidiu-se manter o tempo de reação em 2 h. Assim, utilizou-se um planejamento experimental 2^3 com ponto central, cujos parâmetros foram apresentados na Tabela 3.5.

5.5 Planejamento experimental – Hidrólise ácida

Alguns fatores, assim como a interação dos mesmos, são capazes de interferir no aumento da DQO solúvel. Visando investigar quais fatores e interações seriam mais significativos, realizou-se um planejamento estatístico fatorial com ponto central. A Tabela 4.6 apresenta os níveis das variáveis independentes concentração de DQO particulada, temperatura e concentração de ácido, assim como os resultados em termos de variação da DQO solúvel, em todos os ensaios realizados no planejamento experimental A com tempo de 2 h.

Tabela 4.6 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento A.

Ensaios	DQOp (mg/L)	Temperatura (ºC)	Ácido (%)	ΔDQOs (2 h)	Solubilização (%)
1	-1(1500)	-1(50)	-1(0)	32	1,8
2	1(4500)	-1(50)	-1(0)	-57	4,4
3	-1(1500)	1(150)	-1(0)	1	13,9
4	1(4500)	1(150)	-1(0)	84	20,2
5	-1(1500)	-1(50)	1(1,0)	-78	1,2
6	1(4500)	-1(50)	1(1,0)	18	0,4
7	-1(1500)	1(150)	1(1,0)	249	0,1
8	1(4500)	1(150)	1(1,0)	986	1,7
9 C	0(3000)	0(100)	0(0,5)	119	3,8
10 C	0(3000)	0(100)	0(0,5)	215	6,9
11 C	0(3000)	0(100)	0(0,5)	89	2,8

*Os valores em vermelho representam os resultados negativos.

A Figura 4.4 apresenta o diagrama de Pareto, com a representação gráfica da significância estatística dos fatores e suas interações. Ao lado das barras estão expressos os valores do teste t-Student, sendo os valores negativos representados em vermelho. Pode-se concluir que todos os fatores e interações são estatisticamente significativos, com exceção da curvatura e da interação entre as três variáveis.

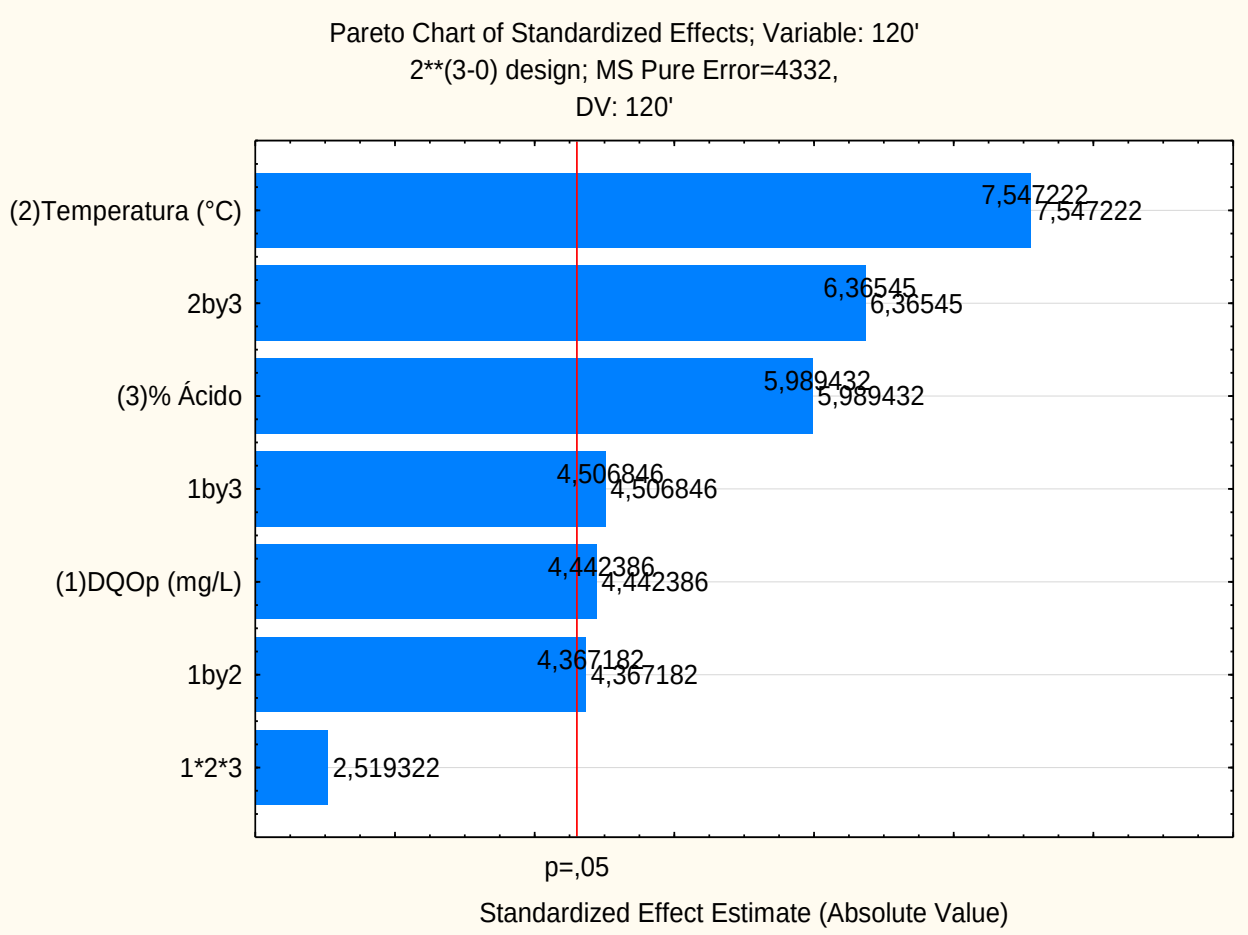

Figura 4.4 – Diagrama de Pareto com resultados do planejamento A.

Uma análise detalhada dos resultados do planejamento A é apresentada no Anexo A. Aqui serão apresentadas somente as superfícies de resposta, consideradas mais relevantes para compreensão dos resultados. A Figura 4.5 apresenta os gráficos de superfície para diferentes interações entre as variáveis. Na interação entre concentração de DQOp e percentual de ácido é possível visualizar que os melhores resultados foram obtidos em condições máximas dos fatores envolvidos. Nota-se que em baixas concentrações de DQOp combinadas com percentuais mais altos de ácido obtém-se resultados satisfatórios, que aumentam com o percentual de ácido. Além disso, a inclinação da curva de superfície permite assumir a não interação dos fatores, conforme também observado no gráfico de médias marginais (Anexo A). No gráfico de superfície para a interação entre concentração de DQOp e temperatura é possível visualizar que melhores resultados foram obtidos em condições máximas dos fatores envolvidos. Nota-se um padrão semelhante ao gráfico que relaciona os parâmetros DQOp e percentual de ácido.

No gráfico de superfície para interação de percentual de ácido e temperatura é possível visualizar que as condições ótimas de solubilização da DQO estão associadas aos valores máximos dos fatores em questão. Percentuais mais baixos de ácido combinados a altas temperaturas levam a resultados melhores quando os mesmos níveis são comparados em outras combinações. Além disso, a inclinação da curva de superfície permite assumir a interação dos fatores, conforme observado no gráfico de médias marginais (Anexo A).

Em resumo, em todos os casos foi possível visualizar um padrão característico para a solubilização da DQO, no qual está presente um aumento da variável resposta em função de condições mais extremas, independente da combinação dos fatores analisados, embora seja notório o aumento da resposta na combinação dos fatores em seus níveis mais altos.

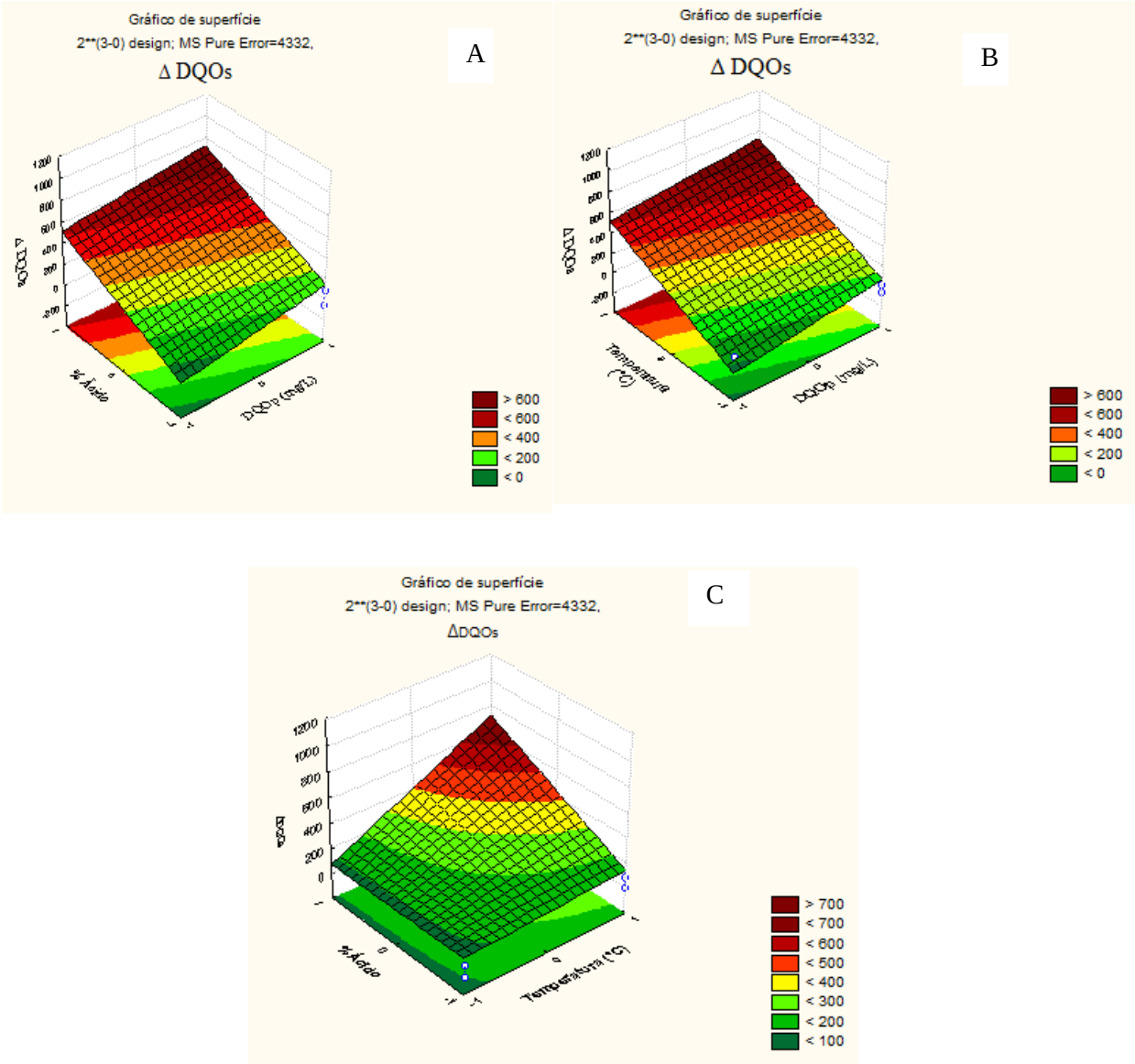

Figura 4.5 – Gráficos de superfície para interações Ácido x DQOp, Temperatura x DQOp e Temperatura x Ácido no planejamento A. Para os gráficos A, B e C a terceira variável foi fixada no nível 1, ou seja, 150°C, 1% de ácido e 4500 mg/L de DQOp, respectivamente.

A fim de viabilizar as condições de hidrólise, optou-se por avaliar temperaturas e concentrações de ácido mais baixas com maiores tempos de hidrólise e mantendo-se os mesmos níveis de DQO particulada, conforme apresentado na Tabela 3.6. No entanto, tais condições foram aplicadas em suspensão de biomassa submetida a um pré-tratamento mecânico. No segundo planejamento experimental fatorial com ponto central realizado (planejamento B), portanto, as amostras foram pré-tratadas mecanicamente e o tempo considerado foi 16 h. Para ambos os casos as variáveis foram as mesmas, entretanto apresentaram diferenças nos valores de temperatura e concentração de ácido. A Tabela 4.7 apresenta os níveis das variáveis independentes e os resultados dos ensaios realizados para o tempo de 16 h.

Tabela 4.7 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento B.

Ensaios	DQOp (mg/L)	Temperatura (ºC)	Ácido (%)	ΔDQOs (16h)	Solubilização (%)
1	-1(1500)	-1(40)	-1(0)	252	11,8
2	1(4500)	-1(40)	-1(0)	434	6,6
3	-1(1500)	1(60)	-1(0)	202	10,3
4	1(4500)	1(60)	-1(0)	418	12,0
5	-1(1500)	-1(40)	1(0,2)	95	12,4
6	1(4500)	-1(40)	1(0,2)	351	8,4
7	-1(1500)	1(60)	1(0,2)	50	12,2
8	1(4500)	1(60)	1(0,2)	389	8,2
9 C	0(3000)	0(50)	0(0,1)	116	1,8
10 C	0(3000)	0(50)	0(0,1)	100	1,5
11 C	0(3000)	0(50)	0(0,1)	115	2,0

A Figura 4.6 apresenta o diagrama de Pareto, com a representação gráfica da significância estatística dos fatores e suas interações. Ao lado das barras estão expressos os valores do teste t-Student, sendo os valores negativos representados em vermelho.

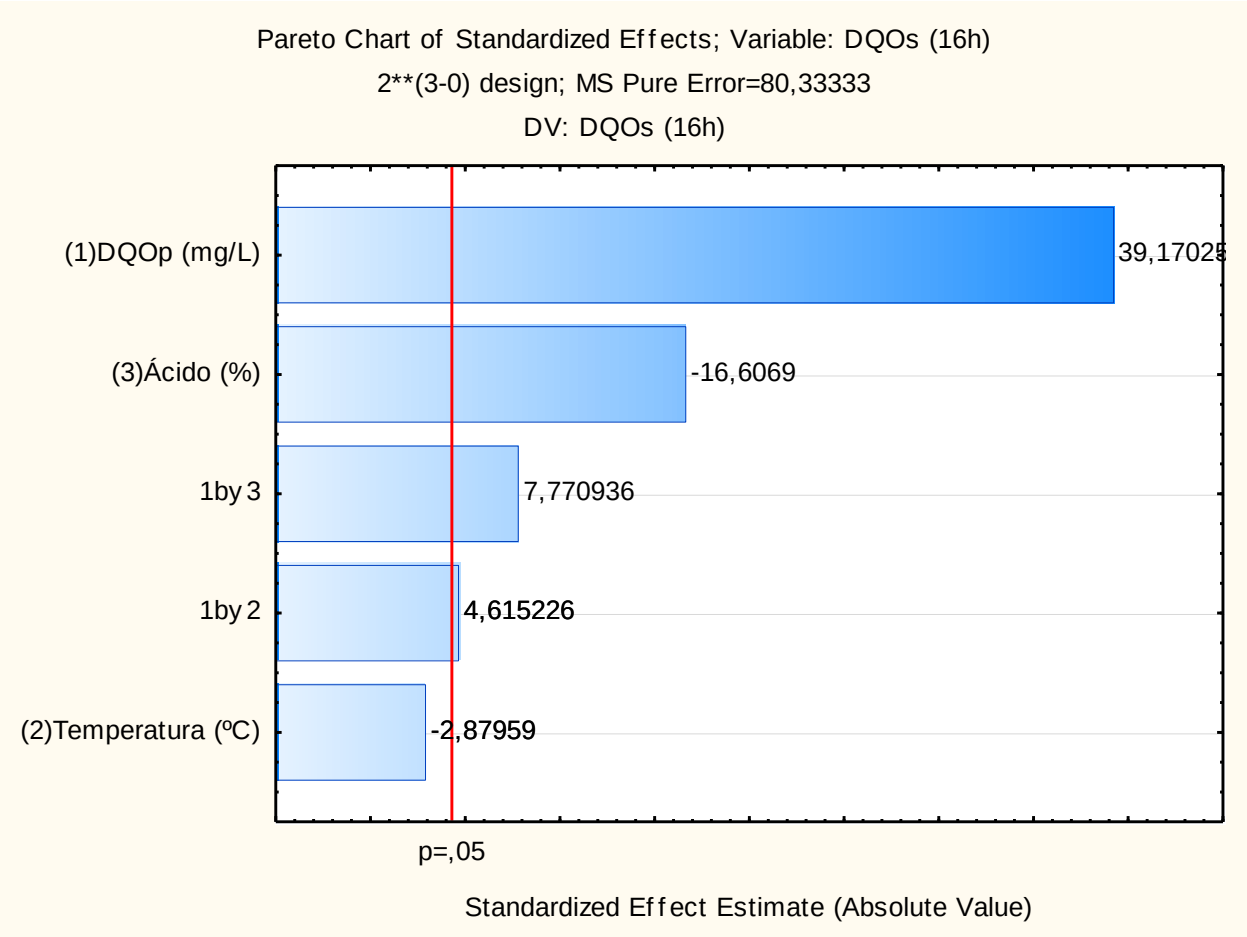

Figura 4.6 – Diagrama de Pareto do planejamento B.

Uma análise detalhada dos resultados do planejamento B é apresentada no Anexo B. A Figura 4.7 apresenta os gráficos de superfície para as interações entre as variáveis concentração de DQOp, percentual de ácido e temperatura. Para a interação entre DQOp e percentual de ácido é possível verificar que melhores resultados foram obtidos a partir de valores intermediários a elevados de concentração de DQOp associados a baixos percentuais de ácido. Valores de resposta elevados são obtidos quando concentrações elevadas de DQOp são combinadas a temperaturas mais elevadas ou mais baixas, corroborando a importância do fator DQOp, já mencionada anteriormente e demonstrando que nesta associação a temperatura não interfere de forma significativa no resultado. Verifica-se através da inclinação da curva que existe uma interação entre os fatores em questão.

Para o conjunto de fatores analisado, foi possível visualizar um padrão característico para a solubilização da DQO, no qual, em todos os casos, o valor máximo de ΔDQOs alcançado foi próximo.

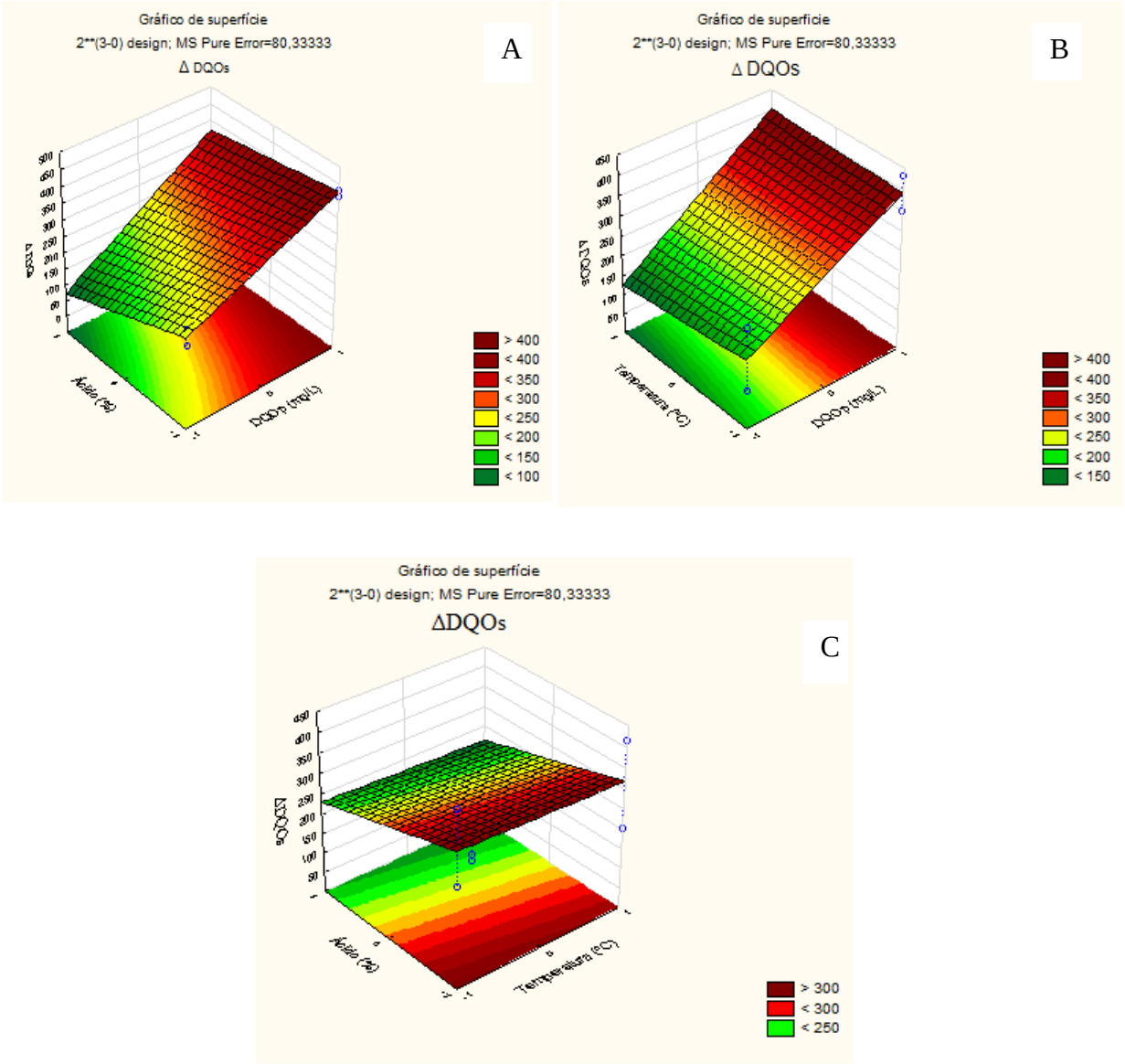

Figura 4.7 – Gráficos de superfície para interações Ácido x DQOp, Temperatura x DQOp e Temperatura x Ácido no planejamento B. Para os gráficos A, B e C a terceira variável foi fixada no nível 1, ou seja, 60°C, 0,2% de ácido e 4500 mg/L de DQOp, respectivamente.

Analisando comparativamente os três gráficos, pode-se observar que a maior resposta foi obtida na associação DQOp e temperatura, e DQOp e ácido, seguida de ácido e temperatura, fato que denota uma importância ainda maior da DQOp. Este resultado é bastante satisfatório, pois a DQOp representa um fator de baixo custo operacional se comparado aos demais. Embora a análise dos gráficos não permita uma definição mais detalhada da relevância das interações, a análise dos coeficientes indica uma maior contribuição da interação DQOp e ácido, em relação à DQOp e temperatura. Novamente, independente da interação, observa-se a importância da DQOp no processo.

4.6 Planejamento experimental – Hidrólise alcalina

No intuito de verificar qual a melhor técnica para hidrolisar a amostra, foi testada uma hidrólise alcalina, com o uso de hidróxido de sódio. Para este planejamento utilizou-se um planejamento experimental 2^3 com ponto central, cujas variáveis e níveis estão dispostos na Tabela 3.7. Nos ensaios realizados manteve-se o tempo de reação de 2 h. A Tabela 4.8 apresenta os níveis das variáveis independentes, concentração de DQO particulada, temperatura e concentração de base, assim como os resultados em termos de variação da DQO solúvel, em todos os ensaios realizados no planejamento experimental C.

Tabela 4.8 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento C.

Ensaios	DQOp (mg/L)	Temperatura (ºC)	Base % (m/v)	ΔDQOs (2 h)	Solubilização (%)
1	-1(1500)	-1(50)	-1(0)	-97	10,7
2	1(4500)	-1(50)	-1(0)	110	4,0
3	-1(1500)	1(150)	-1(0)	-37	11,4
4	1(4500)	1(150)	-1(0)	23	11,6
5	-1(1500)	-1(50)	1(1,0)	77	3,1
6	1(4500)	-1(50)	1(1,0)	592	1,1
7	-1(1500)	1(150)	1(1,0)	391	3,4
8	1(4500)	1(150)	1(1,0)	800	5,4
9 C	0(3000)	0(100)	0(0,5)	-369	7,2
10 C	0(3000)	0(100)	0(0,5)	-330	7,2
11 C	0(3000)	0(100)	0(0,5)	-349	8,1

*Os valores em vermelho representam percentuais negativos.

A Figura 4.8 apresenta o diagrama de Pareto, com a representação gráfica da significância estatística dos fatores e suas interações. Ao lado das barras estão expressos os valores do teste t-Student, sendo os valores negativos representados em vermelho. Observou-se que os parâmetros Base (concentração de NaOH) e DQOp são os que mais influenciaram de forma positiva a hidrólise.

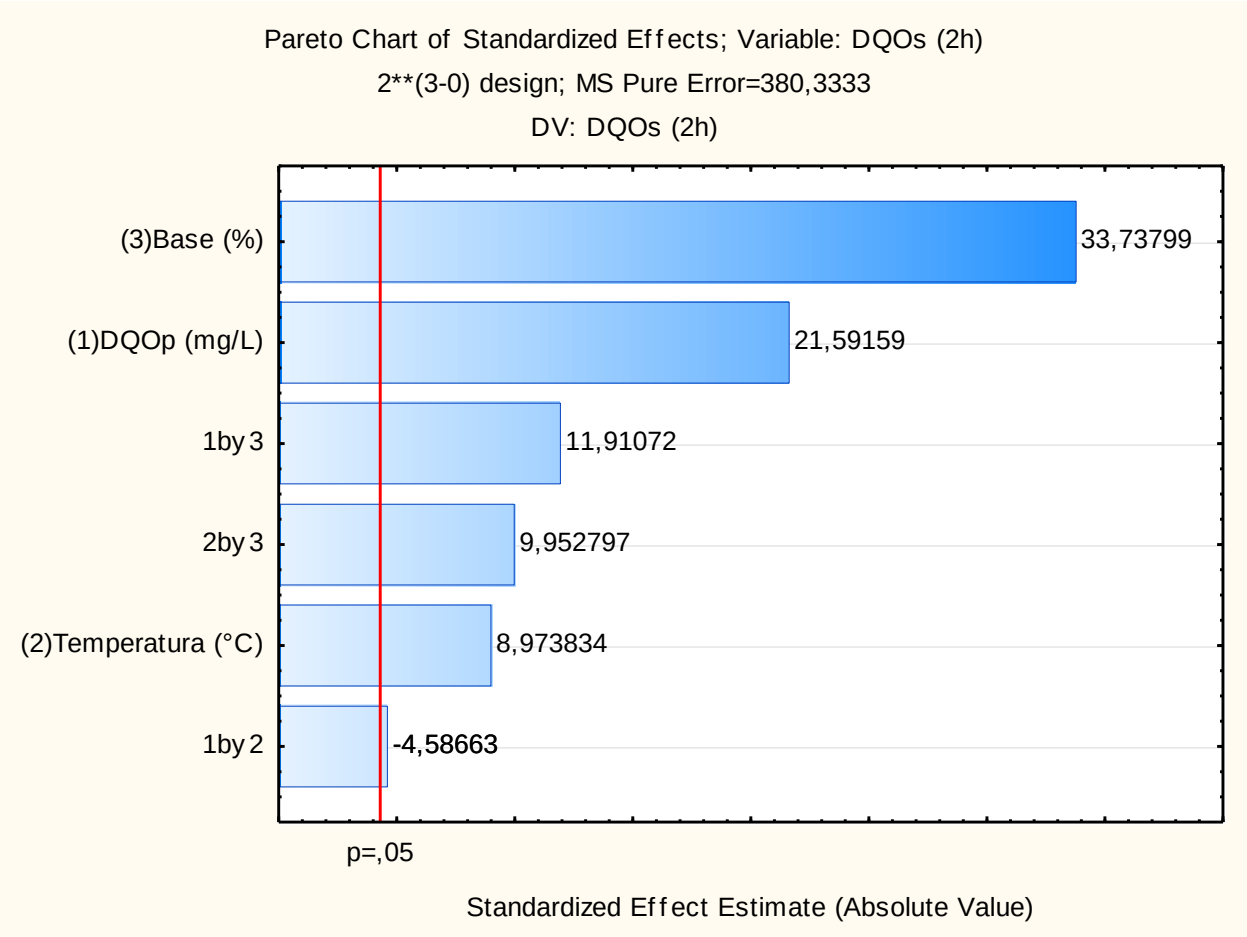

Figura 4.8 – Diagrama de Pareto para os resultados do planejamento C.

Uma análise detalhada dos resultados do planejamento C é apresentada no Anexo C. A Figura 4.9 mostra os gráficos de superfície de resposta para as interações entre concentração de DQOp, Concentração de NaOH (Base) e temperatura. Para a interação entre concentração de DQOp e Base é possível verificar que melhores resultados foram obtidos a partir de valores máximos de concentração de DQOp e Base. A interação entre Temperatura e DQOp necessita de valores intermediários para mostrar um aumento na solubilização da DQO, tendo seu valor aumentado proporcionalmente conforme a elevação dos parâmetros. É possível observar que a interação entre Temperatura e Base proporciona resultados elevados quando utilizadas condições extremas de ambas.

A análise das superfícies de resposta, apresentadas na Figura 4.9, corrobora o resultado proposto pelo diagrama de Pareto. Ambos mostraram uma fraca interação entre Base e Temperatura e DQOp e Temperatura, destacando como fatores principais a DQOp e a concentração de Base, cuja associação fornece valores elevados de ΔDQOs quando comparada aos demais fatores e suas interações.

De acordo com Chen e Oswald (1998) o fator de mais relevância é a temperatura, entretanto tais resultados são obtidos através da combinação de elevadas temperaturas e

tempo prolongado de contato da biomassa com NaOH. Assim, os resultados apresentados anteriormente sugerem que para temperaturas elevadas, associadas a tempos de contato inferiores (2h), o fator de maior relevância é a concentração de base, assim como sua associação com a DQOp. Esta condição de hidrólise pode tornar o processo menos oneroso.

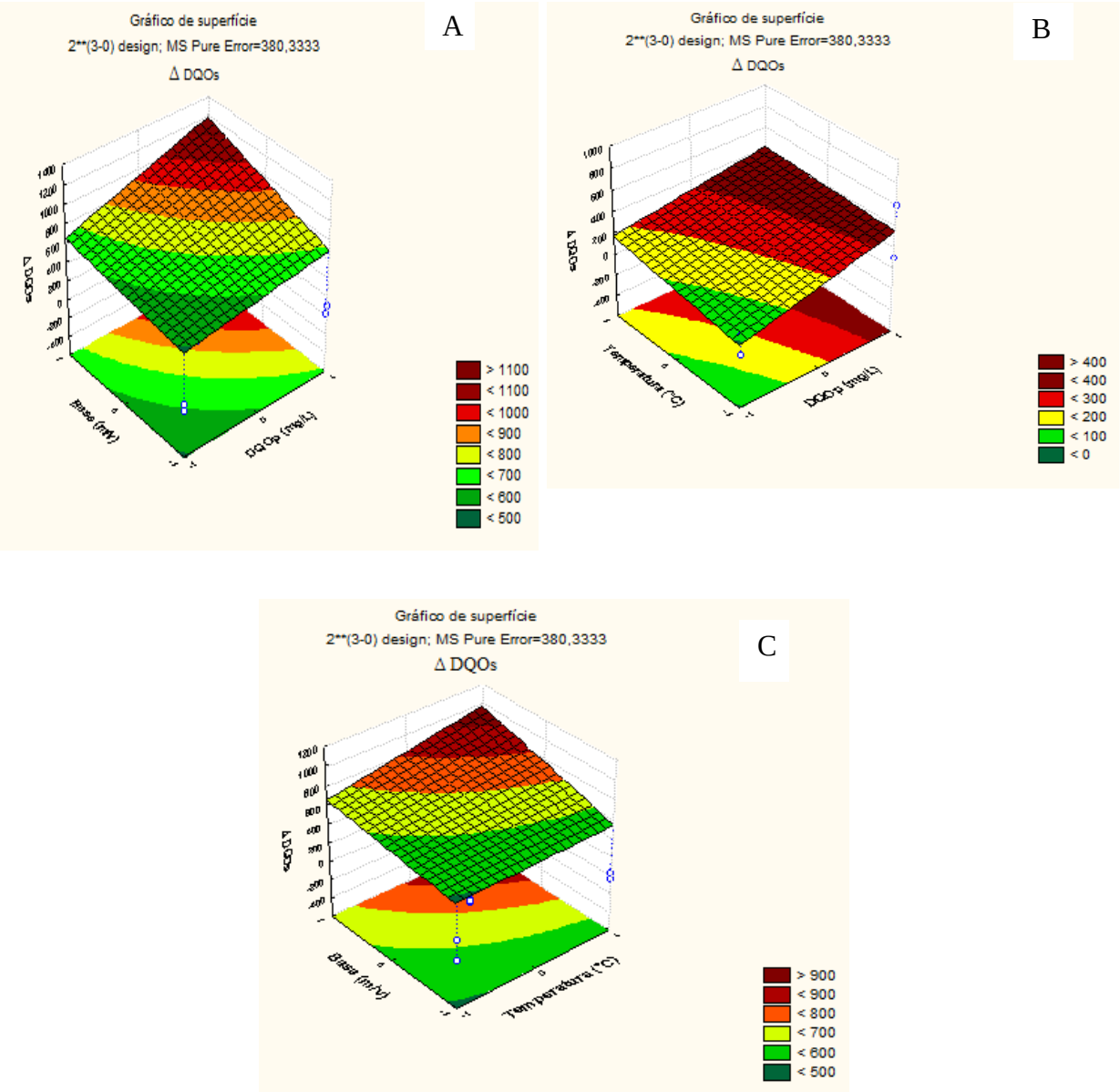

Figura 4.9 – Gráficos de superfície para interações Base x DQOp, Temperatura x DQOp e Temperatura x Base no planejamento C. Para os gráficos A, B e C a terceira variável foi fixada no nível 1, ou seja, 150°C, 1% de base e 4500 mg/L de DQOp, respectivamente.

Seguindo o mesmo procedimento adotado na hidrólise ácida, também se procurou viabilizar condições de hidrólise mais brandas com maiores tempos de hidrólise (16 h) e suspensão de biomassa submetida a um pré-tratamento mecânico, conforme apresentado na Tabela 3.8. A Tabela 4.9 apresenta os níveis das variáveis independentes e os resultados dos

ensaios realizados para as novas condições do planejamento estatístico fatorial com ponto central, denominado planejamento D.

Tabela 4.9 – Níveis das variáveis independentes e resultados do planejamento D.

Ensaios	DQOp (mg/L)	Temperatura (ºC)	Base % (m/v)	ΔDQOs (16 h)	Solubilização (%)
1	-1(1500)	-1(40)	-1(0)	47	18,4
2	1(4500)	-1(40)	-1(0)	507	11,0
3	-1(1500)	1(60)	-1(0)	172	12,6
4	1(4500)	1(60)	-1(0)	155	1,5
5	-1(1500)	-1(40)	1(0,2)	337	1,3
6	1(4500)	-1(40)	1(0,2)	709	5,5
7	-1(1500)	1(60)	1(0,2)	177	11,8
8	1(4500)	1(60)	1(0,2)	577	0,7
9 C	0(3000)	0(50)	0(0,1)	-119	2,2
10 C	0(3000)	0(50)	0(0,1)	-173	5,1
11 C	0(3000)	0(50)	0(0,1)	128	5,5

*Os valores em vermelho representam percentuais negativos.

O diagrama de Pareto com a representação gráfica da significância estatística dos fatores e suas interações pode ser observado na Figura 4.10. Ao lado das barras estão expressos os valores do teste t-Student, sendo os valores negativos representados em vermelho. Nota-se que nenhum dos fatores cruza a linha que marca a significância, considerando um nível de significância de 95% (p-level < 0,05).

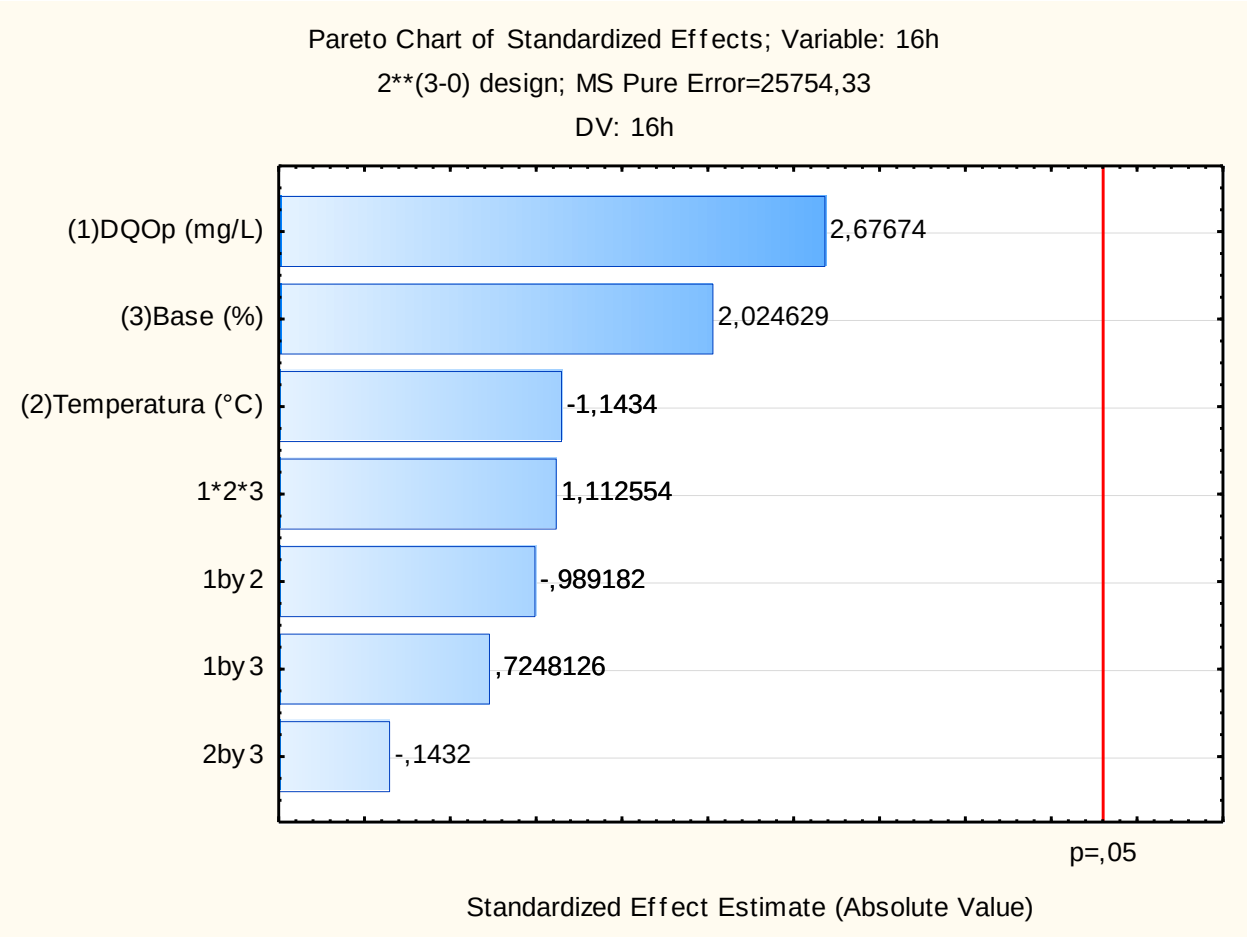

Figura 4.10 – Diagrama de Pareto com resultados do planejamento D.

Embora ensaios preliminares tenham apontado um tempo ótimo de hidrólise de 16 h, os resultados sugerem que este tempo pode não ter sido suficiente para tornar eficaz o processo de hidrólise. Resultados não satisfatórios encontrados na etapa de digestão anaeróbia podem estar relacionados à combinação de tempo de reação e temperatura. A elevação destes parâmetros pode acarretar o aumento da volatilização de compostos orgânicos ou a degradação de substâncias necessárias à atividade microbiana (CHEN & OSWALD, 1998).

Assim, no intuito de averiguar se a eficiência da hidrólise alcalina em condições mais brandas estaria associada ao tempo de reação, um novo planejamento, considerando novamente as condições expressas na Tabela 3.8, foi realizado, alterando-se somente o tempo de reação para 24 h. Novamente, nenhum dos fatores e interações demonstrou significância estatística, sugerindo-se que para condições mais brandas de hidrólise alcalina, tempos maiores são necessários, provavelmente superiores a 24 h (os resultados da análise estatística estão no Anexo D).

Considerando os resultados obtidos na hidrólise alcalina, os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram conduzidos somente com biomassa bruta e após hidrólise ácida, apresentados a seguir.

4.7 Ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia com Biomassa após Hidrólise ácida

Após a análise dos resultados do planejamento A (item 4.5 e Anexo A), foram determinadas como melhores condições para os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia as condições apresentadas na Tabela 4.10. Visando tornar as condições passíveis de se trabalhar em escala industrial, a seleção das condições foi também associada com o custo operacional, por isso foram combinados diferentes valores de temperatura e percentuais de ácido para um valor fixo de DQOp, haja visto que as condições de DQOp alta apresentadas no planejamento foram as que levaram a melhores resultados de solubilização da DQO.

Tabela 4.10 – Condições selecionadas para ensaios de biodegradabilidade anaeróbia de acordo com o planejamento experimental A (2h – sem pré-tratamento).

Condição	DQOp (mg/L)	Temperatura (°C)	Ácido (% v/v)
1	4500	150	0,5
2	4500	100	1
3	4500	100	0,5

A fim de verificar o efeito da adaptação do lodo aos constituintes da biomassa de microalgas bruta e hidrolisada, três contatos da biomassa com o lodo foram avaliados. A Figura 4.11 apresenta a produção de biogás ao longo do tempo em cada um dos contatos, nas três condições de hidrólise, juntamente com um Controle com biomassa bruta, sem hidrólise.

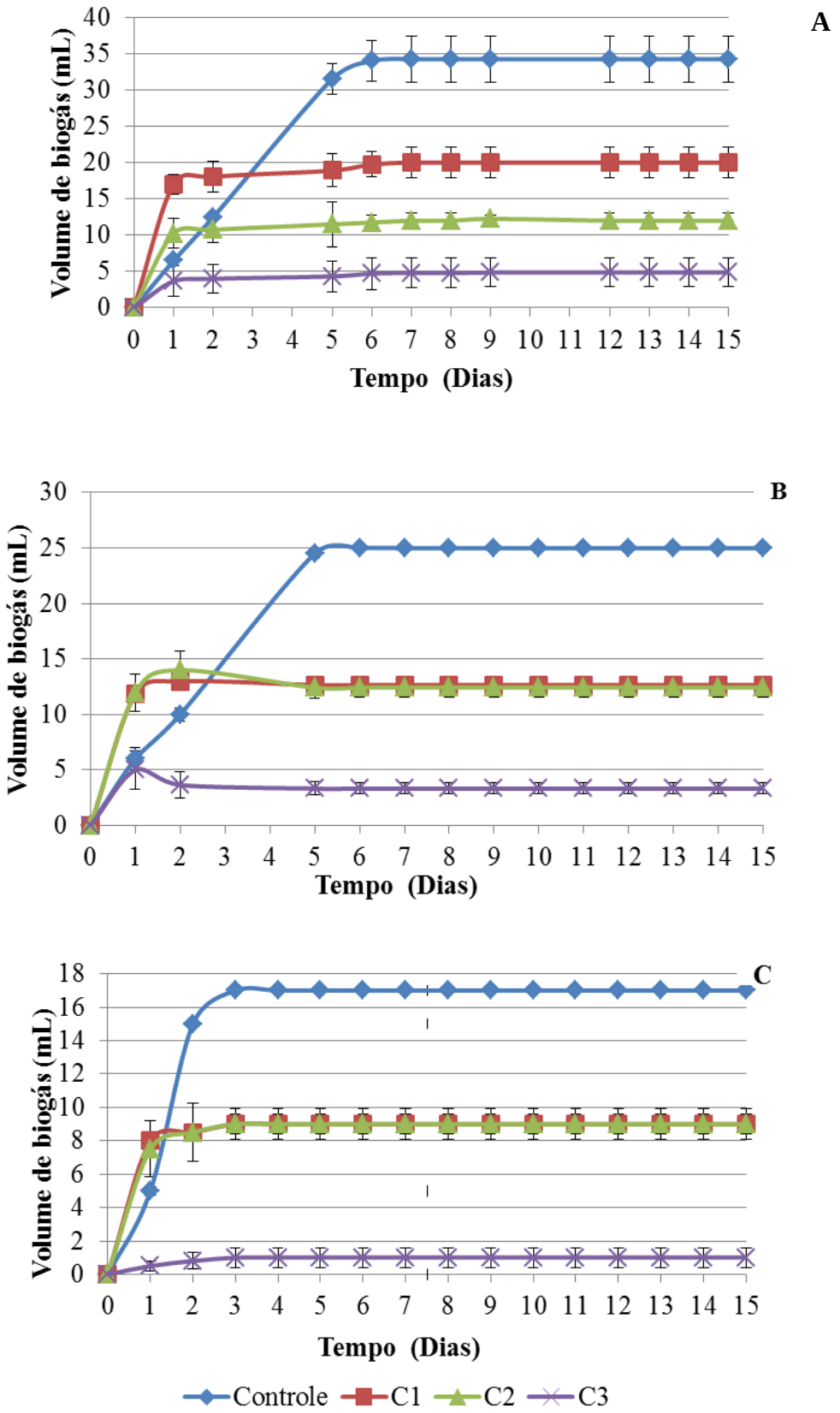

Figura 4.11 – Volume de biogás (30ºC) produzido ao longo do tempo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia no primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) contatos, nas condições Controle (biomassa sem hidrólise) e com biomassas hidrolisadas a 150ºC/0,5% ácido (Condição C1), 100ºC/1% ácido (condição C2) e 100ºC/0,5% ácido (condição C3).

No primeiro contato (Figura 4.11 A) o ensaio durou um tempo total de 12 dias, embora a produção de biogás tenha estabilizado no 6º dia. No segundo contato da biomassa com o lodo (Figura 4.11 B), o ensaio durou um tempo total de 6 dias quando ocorreu a estabilização da produção de biogás. No terceiro contato da biomassa com o lodo (Figura 4.11 C), o ensaio durou um tempo total de 4 dias para a estabilização da produção de biogás.

Na condição Controle, o tempo para se atingir a estabilização da produção de biogás foi reduzido de 6 para 5 e 3 dias, indicando uma assimilação mais rápida dos substratos disponíveis (DQO solúvel inicial) do primeiro para o segundo e terceiro contatos. Nesta condição, a taxa inicial de produção de biogás se manteve em 5 – 6 mL/d nos três contatos, o que confirma a adaptação dos micro-organismos e assimilação dos substratos frente à mesma alimentação.

Nos ensaios com biomassa hidrolisada, ao contrário do esperado, o volume final de biogás foi menor (1,0 a 20,0 mL) que na condição Controle (17,0 a 34,6 mL) em todos os três contatos. A hidrólise disponibiliza uma quantidade maior de substrato para assimilação pelos micro-organismos (DQOs de 1034 e 541 mg/L para C1 e C2) que no Controle (DQOs de 303 mg/L), o que pode explicar as maiores taxas iniciais de produção de biogás. A taxa inicial de produção de biogás nos experimentos com biomassa hidrolisada foi de 10 a 17, 12 e 8 mL/d, no primeiro, segundo e terceiro contatos, respectivamente, enquanto no Controle a taxa se manteve em 6, 6 e 5 mL/d. Apesar das maiores taxas iniciais de produção de biogás, os substratos assimiláveis nos hidrolisados devem se esgotar mais rapidamente, estabilizando a produção de biogás por escassez de matéria orgânica no meio reacional em tempos cada vez menores, à medida que o lodo se adapta.

Comparando a produção de biogás do primeiro para o terceiro contato nos experimentos com biomassa hidrolisada: de 4,9 a 20,0 mL para 3,3 a 12,7 mL e 1,0 a 9,0 mL do primeiro para o segundo e terceiro contatos, respectivamente, verifica-se uma diminuição acentuada na produção de biogás no terceiro contato. Esta redução pode ser devido ao acúmulo de substâncias inibidoras da digestão anaeróbia. Uma hipótese seria o acúmulo de íons Na^+ no lodo devido à neutralização do pH após hidrólise ácida com $NaHCO_3$ (CHEN et al., 2008).

Uma comparação dos resultados obtidos no Controle e na Condição 3 no terceiro contato, com o lodo mais adaptado e valores iniciais de DQOs similares, mostra que na condição com adição de elevada quantidade de Na^+ a produção de biogás e o percentual de metano são muito menores.

Uma comparação entre as condições de hidrólise mostra que os volumes de biogás diminuem da Condição C1 para C2 e C3, provavelmente em função da redução da concentração inicial de DQO solúvel também diminuir nesta ordem. Este resultado comprova que o substrato solubilizado é melhor convertido a biogás, em comparação à biomassa bruta. No entanto, elevadas concentrações de ácido requerem altas quantidades de álcalis para a neutralização do pH, o que certamente deve contribuir para a inibição dos micro-organismos. Uma combinação destes dois fatores levou aos resultados obtidos em termos de produção de biogás.

A Tabela 4.11 apresenta a composição de metano no biogás produzido nas diferentes condições mediante adaptação do lodo às biomassas bruta e hidrolisada. A pequena alteração do pH em todos os contatos denota baixa liberação de espécies alcalinas, como NH_4^+, corroborando com as baixas concentrações de proteína nos hidrolisados (comentado no item 4.8 a seguir). Foi possível constatar que a repetição, representada pelo segundo contato, resultou na manutenção (Condições C2 e C3) ou pequena redução (condições Controle e C1) da produção de biogás, mas em expressiva redução do % metano no biogás (de 44 até 75%) em detrimento do CO_2, analisando-se o processo como um todo. Tal resultado indica uma inibição acentuada das arqueias metanogênicas e/ou uma limitação severa de substratos assimiláveis no meio reacional.

Tabela 4.11 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia: volume e composição de biogás nas condições Controle (biomassa sem hidrólise) e com biomassas hidrolisadas a 150ºC/0,5% ácido (Condição 1), 100ºC/1% ácido (condição 2) e 100ºC/0,5% ácido (condição 3).

	pH inicial	DQOs Inicial (mg/L)	pH final	Volume biogás (mL)	Volume CH_4 (mL)	% CH_4
Primeiro contato						
Controle	7,1	303	7,5	34,6	23,9	69,0
Condição 1	7,0	1034	7,5	20,0	1,6	8,0
Condição 2	7,0	541	7,3	12,0	1,0	8,0
Condição 3	7,0	239	7,2	5,0	1,0	20,0
Segundo contato						
Controle	7,0	234	7,3	25,0	6,2	25,0
Condição 1	6,9	988	7,2	12,7	0,6	4,5
Condição 2	6,9	570	7,2	12,3	0,2	2,0
Condição 3	7,0	227	7,2	3,3	0,2	6,5
Terceiro Contato						
Controle	7,0	298	6,7	17	4,10	24,0
Condição 1	6,9	1030	7,3	9	0,32	3,5
Condição 2	6,9	570	7,2	9	0,18	2,0
Condição 3	6,9	264	7,2	1	0,05	5,0

*Valores médios de triplicatas.

Embora a caracterização da biomassa sinalize para uma etapa de hidrólise como pré-tratamento, os resultados de biodegradação indicam que o ensaio Controle apresentou uma maior produção de biogás. No entanto, verificou-se que esta produção é menor se comparada às demais condições, no que se refere à produção diária até o segundo dia. Assim, optou-se por avaliar a biodegradabilidade anaeróbia dos hidrolisados produzidos sob condições mais brandas, com uma etapa preliminar de tratamento mecânico e um maior tempo de reação (16 h).

Após a análise dos resultados do planejamento B (item 4.5 e Anexo B), foram determinadas como melhores condições para os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia as condições apresentadas na Tabela 4.12, sendo a Condição 1 um ensaio Controle com biomassa sem tratamento mecânico e a Condição 2 um outro ensaio Controle com biomassa após pré-tratamento mecânico.

Tabela 4.12 – Condições selecionadas para ensaios de biodegradabilidade anaeróbia de acordo com o planejamento experimental B.

Condição	DQOp (mg/L)	Temperatura (°C)	Ácido (%)
1	4500	50	0
2	4500	50	0
3	4500	40	0,2
4	4500	60	0
5	4500	40	0

*1- sem pré-tratamento mecânico; 2- com pré-tratamento mecânico.

A Figura 4.12 e Tabela 4.13 apresentam a produção de biogás ao longo do tempo e dados de produção e composição do biogás, respectivamente, em cada uma das condições de hidrólise selecionadas, juntamente com os Controles com biomassa bruta, sem e com pré-tratamento mecânico.

As condições Controle apresentaram menores valores de produção de biogás, comparadas ao experimento anterior (Figura 4.12). Considerando que os valores iniciais de DQOp e DQOs eram similares, tal resultado se deve, provavelmente, a uma composição celular diferente das microalgas. A coleta da biomassa era feita em períodos e condições distintas de cultivo, o que pode influenciar a composição microbiana e a digestão anaeróbia (HABIG, 1985).

O tratamento mecânico da biomassa resultou em menor produção de biogás, indicando que o rompimento de membrana somente não é suficiente para promover a digestão

anaeróbia. Verificou-se que a condição 3 (40ºC/0,2%/16 h) apresentou volume de biogás (26,0 mL) pouco maior que o ensaio Controle sem pré-tratamento mecânico (22,0 mL). A taxa inicial de produção de biogás foi maior no experimento com biomassa hidrolisada (11 mL/d) que nos Controles 1 (2,5 mL/d) e 2 (2,0 mL/d), indicando que a hidrólise disponibilizou uma quantidade maior de substrato para assimilação pelos micro-organismos. De fato, pela Tabela 4.13, verifica-se um maior valor de DQOs na condição 3. Após a digestão deste material solubilizado, a produção de biogás estabilizava, provavelmente devido à limitação de substrato.

As condições de hidrólise térmica, sem adição de ácido, apresentaram os menores valores de produção de biogás e metano. A pouca modificação da estrutura celular nestas condições pode ter causado este resultado.

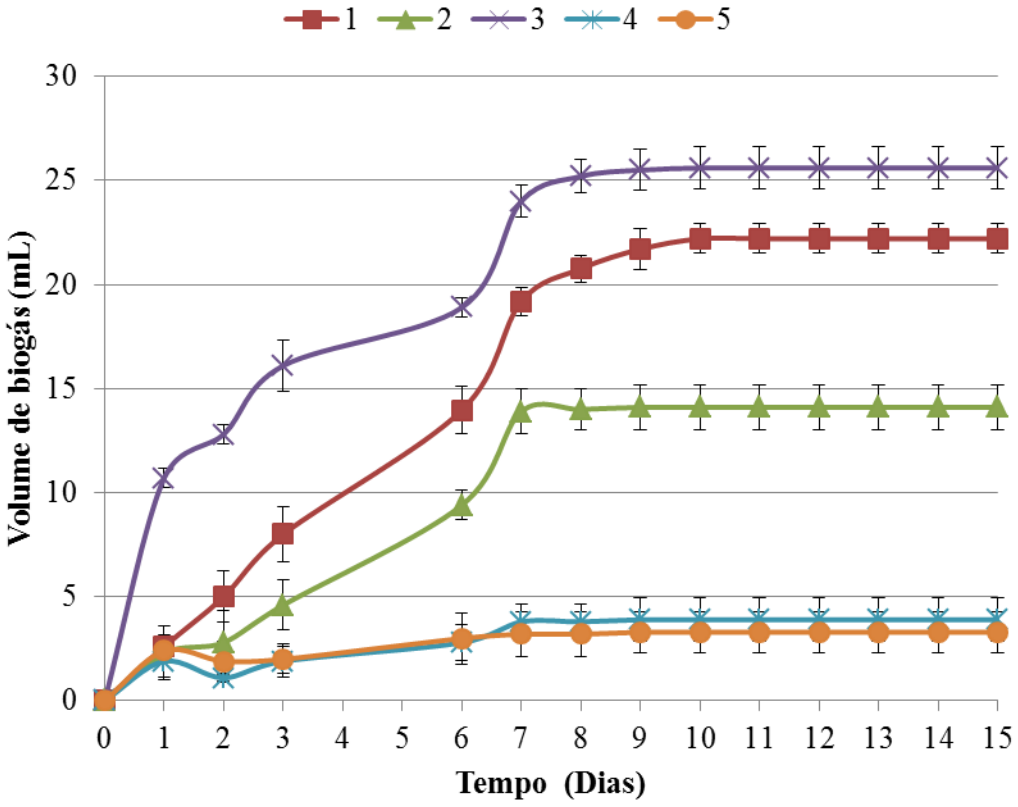

Figura 4.12 – Volume de biogás (30ºC) produzido ao longo do tempo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia nas condições Controle 1 (sem pré-tratamento mecânico), Controle 2 (com pré-tratamento mecânico) e com biomassas hidrolisadas nas condições 3 (40ºC/0,2%/16 h), 4 (60ºC/16 h) e 5 (40ºC/16 h).

Tabela 4.13 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia: volume e composição de biogás nas condições Controle 1 (sem pré-tratamento mecânico), Controle 2 (com pré-tratamento mecânico) e com biomassas hidrolisadas nas condições 3 (40ºC/0,2%/16 h), 4 (60ºC/16 h) e 5 (40ºC/16 h).

Ensaios	pH inicial	DQOs inicial	pH final	DQOs final	ηDQO (%)	Volume de biogás (ml)	% CH_4
1	6,9	343	6,6	98	71,4	22,0	79,4
2	6,9	363	6,6	74	79,6	12,7	79,0
3	6,8	436	7,2	227	47,9	26,0	63,1
4	6,9	249	6,6	22	91,2	3,7	77,6
5	7,0	236	7,0	44	81,4	3,0	76,3

*Valores médios de triplicatas.

5.8 Influência da composição dos hidrolisados sobre a biodegradabilidade anaeróbia

A partir da quantificação da composição dos hidrolisados em termos de carboidratos e proteínas pode-se explicar os resultados obtidos nos experimentos de biodegradabilidade anaeróbia. Os carboidratos apresentam grande quantidade de ligações hidrogênio dentro das cadeias, fato que diminui sua interação com a água, ou seja, sua solubilidade. Desta forma é necessária uma etapa de hidrólise ácida para que ocorra a solubilização desses compostos. Entretanto, sabe-se que durante o processo de hidrólise, compostos como dextrinas são formados, limitando a ação da hidrólise (JUNIOR, 2008).

Para investigar a relação entre os produtos da hidrólise e os resultados da digestão anaeróbia, foram realizadas análises de carboidratos e proteína na fração solúvel da biomassa de algas em estudo antes (Controle) e após hidrólise. As concentrações obtidas podem ser observadas na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Valores de concentração de carboidrato e proteína para os planejamentos realizados.

Planejamento	Amostras	Carboidrato (mg glicose/L)	Proteínas (mg/L)
Primeiro Planejamento Ácido (Planejamento A)	Controle	38	0,036
	C1	182	0,362
	C2	120	0,175
	C3	56	0,08
Segundo Planejamento Ácido (Planejamento B)	1	85	0,074
	2	70	0,064
	3	180	0,092
	4	36	0,057
	5	32	0,024
Planejamento alcalino (Planejamento C)	1	85	0,074
	2	70	0,064
	3	112	0,11
	4	86	0,043

*Valores médios de triplicatas.

A partir da análise de carboidratos e proteínas pode-se observar que existe uma concentração muito superior de carboidratos em comparação à concentração de proteínas. Este resultado se deve provavelmente ao somatório de carboidratos intracelulares, liberados após lise celular, e carboidratos extracelulares liberados após solubilização do revestimento externo das células, tendo em vista que em termos de conteúdo celular os percentuais de carboidratos eram mais baixos que o de proteínas (Tabela 4.1).

Habig (1985) cita que o aumento dos níveis de carboidrato na fase solúvel influencia positivamente a produção de biogás. Briand (1997) reportou que elevadas concentrações de carboidratos são favoráveis à produção de metano, pois a partir de seu fracionamento são formados precursores da metanogênese. Nota-se que as condições de hidrólise que apresentaram uma maior produção de biogás (C2 e C3 no planejamento A e 3 no planejamento B), apresentam uma maior concentração de carboidrato disponível na fase solúvel, corroborando os resultados de Habig (1985) e Briand (1997).

O rendimento de metano apresentou variabilidade de um ensaio para o outro, embora o mesmo comportamento possa ser observado nos ensaios Controle, nos quais ocorre maior produção de volume de metano ao fim dos experimentos, estabelecendo-se assim um padrão semelhante para todos os ensaios Controle. Esta variabilidade pode ser atribuída aos diferentes lotes de amostras empregados nos experimentos, uma vez que o cultivo era realizado em batelada. Habig (1985) reportou que tais flutuações na produção de biogás estão relacionadas às diferentes bateladas de um mesmo substrato, o que ocorre no presente caso.

4.9 Efeito da salinidade na produção de metano

Vários íons apresentam grande influência no processo de digestão anaeróbia, sendo um dos principais o íon Na^+. Chen (2008) mencionou que valores moderados de sódio podem estimular o crescimento de micro-organismos; no entanto, quantidades excessivas podem retardar o crescimento dos mesmos.

Em virtude do caráter marinho da microalga, o meio de cultivo utilizado neste trabalho recebe a adição de 35g NaCl/L, e embora haja um posterior processo de filtração/centrifugação objetivando a concentração da biomassa e reuso do meio de cultivo, é possível que permaneça uma concentração residual de sal na biomassa.

Visando obter uma maior produção de metano, decidiu-se avaliar a influência do Na^+ na digestão anaeróbia da biomassa de algas. Para este experimento optou-se por comparar a melhor condição de hidrólise encontrada (Ensaio 3 de hidrólise ácida – 40ºC/0,2%/16 h),

empregando-se biomassa com e sem uma etapa de pré-lavagem com água destilada, conforme mostra a Figura 4.13 e a Tabela 4.15. A condição sem pré-lavagem foi utilizada como Ensaio Controle, tendo seu pH ajustado com auxilio de bicarbonato de sódio, enquanto a condição com pré-lavagem teve seu pH ajustado com hidróxido de cálcio, visando minimizar as concentrações de sódio na amostra.

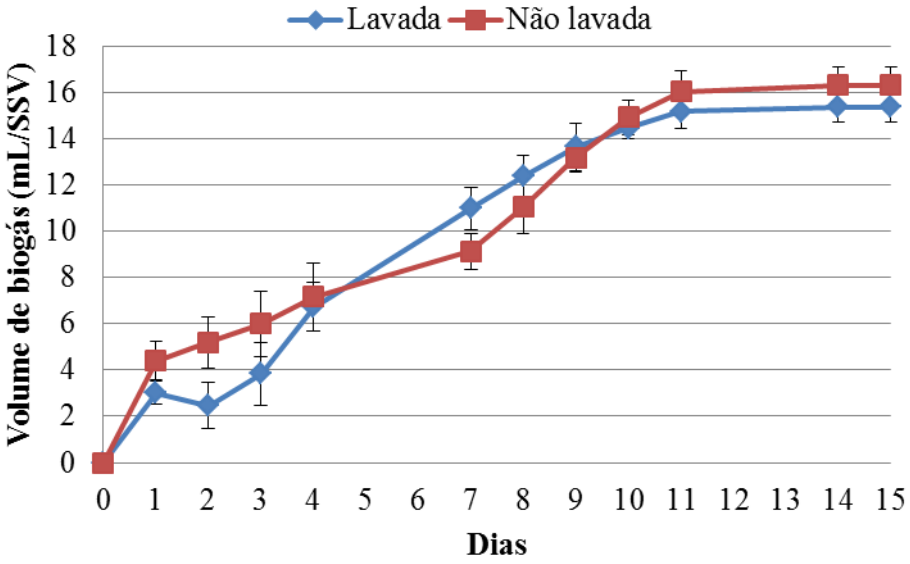

Figura 4.13 – Avaliação da produção de biogás ao longo do tempo

Tabela 4.15 – Avaliação da produção de metano e dióxido de carbono com biomassa com e sem pré-lavagem, submetida à condição de hidrólise 40ºC/0,2% ácido/16 h.

Pré-Lavagem	Volume de biogás (mL)	% CH_4	%CO_2
Sim	15	86,5	12,0
Não	16,5	30,0	69,0

Observou-se que a condição com biomassa pré-lavada foi a que apresentou maior volume de metano, cerca de 13 mL, enquanto na condição com biomassa não lavada obteve-se cerca de 5,0 mL de metano, ou seja, a condição com biomassa lavada apresentou rendimento em metano acima do dobro da condição com biomassa não lavada.

No intuito de confirmar a influência da concentração de sódio no resultado obtido anteriormente, foi realizada uma análise de Cloretos, pois no meio de cultivo da biomassa de microalgas, o cloreto está predominantemente associado ao íon sódio. O resultado pode ser observado na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Concentração de cloreto e sódio nas amostras de biomassa.

Amostras de biomassa	Concentração (mg/L)			
	Cl^-	Na^+ residual	Na^+ adicionado	Na^+ total
Lavada	100	64,8	--	64,8
Não lavada	1700	1101,4	2464,3	3565,7

Com base na concentração de cloreto encontrada, estimou-se a concentração de sódio na suspensão de biomassa lavada e não lavada. No ensaio com biomassa não lavada, além do sódio residual, adicionou-se também sódio na forma de bicarbonato de sódio para ajuste do pH. Ao final, obteve-se uma concentração de sódio de 3565,7 mg/L para a amostra não lavada e de apenas 64,8 mg/L para amostra lavada.

Embora os resultados de produção de biogás tenham sido similares para as amostras lavada e não lavada, o volume de metano produzido foi muito maior na amostra lavada, sugerindo que não há uma inibição total da digestão anaeróbia, mas um comprometimento da etapa metanogênica. Os resultados de concentração de sódio indicam que pode estar ocorrendo uma inibição moderada. Chernicharo (2007) menciona que concentrações de sódio de 3500 a 5500 mg/L apresentam caráter moderadamente inibitório no processo de digestão anaeróbia.

McCarty & McKinney (1961) revelaram que cloretos de íons monovalentes como sódio causam uma maior toxicidade ao lodo do que cloretos de íons bivalentes, como por exemplo, o cálcio. Reportam ainda que a concentração de 2.370 mg/L de NaCl exerce efeito inibitório sobre a digestão anaeróbia. No presente estudo, considerando apenas a concentração residual de NaCl, temos uma concentração de 2801,4 mg/L, corroborando o que está relatado na literatura.

Em resumo, a digestão anaeróbia da biomassa *in natura* e da biomassa após hidrólise ácida apresentou rendimentos em metano similares: 9,87 L CH_4/kg SVT biomassa (Controle 1 - Tabela 4.13) e 9,27 L CH_4/kg SVT biomassa (condição 3 - Tabela 4.13) e bem menores que os reportados na literatura (Tabela 2.12). Valores mais baixos nas duas condições são devido à inibição por sódio; no entanto, ainda assim, a hidrólise ácida facilita a conversão da biomassa em metano, pois enquanto a produção de biogás estabiliza após 10 dias no Controle, na Condição 3 a estabilização ocorre em 8 dias. Eliminando a inibição por sódio na digestão anaeróbia, percebe-se um melhor rendimento de metano para a biomassa após hidrólise ácida (15,9 L CH_4/kg SVT biomassa – biomassa com pré-lavagem – Tabela 4.16) em comparação ao Controle (6,14 L CH_4/kg SVT biomassa – biomassa sem pré-lavagem - Tabela 4.16).

Ocorre um aumento de 71,5% no rendimento de metano (na condição 3), comprovando a importância da redução da concentração de sódio na digestão anaeróbia.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho levam a uma série de reflexões sobre a produção de metano a partir de biomassa da microalga *Isochrysis galbana*, a saber:

- a digestão anaeróbia da biomassa *in natura* é demasiadamente lenta (produção de biogás estabiliza após 10 dias) e apresenta rendimento em metano muito baixo (em torno de 10L CH_4/kg SVT biomassa). A fim de aumentar o aproveitamento da matéria orgânica contida na biomassa e, consequentemente, o rendimento em metano, faz-se necessário o emprego de métodos de pré-tratamento mecânico, químico, térmico e enzimático que podem disponibilizar maior quantidade de matéria orgânica para assimilação pelos micro-organismos na etapa de digestão anaeróbia;
- Dentre estes métodos de pré-tratamento, o tratamento químico seria um dos tratamentos com melhor relação custo x benefício. No entanto, o emprego da hidrólise ácida como pré-tratamento requer a adição de ácido e, posteriormente, de álcalis a fim de se ajustar o pH em níveis adequados à atividade microbiana. Este ajuste de pH não só aumenta o consumo de produtos químicos como também aumenta a concentração de sódio no meio reacional, considerando que tradicionalmente é feito com bicarbonato de sódio, o que pode levar à inibição dos micro-organismos anaeróbios;
- A hidrólise ácida apresenta rendimentos de metano muito maiores se comparados a hidrólise alcalina;
- O emprego de espécies de microalgas marinhas, também leva a altas concentrações de sódio na biomassa a ser digerida. Para contornar este problema, uma alternativa é a lavagem da biomassa para redução da concentração de sódio, levando ao consumo de água limpa;
- Após a lavagem da biomassa, o rendimento na produção de metano alcança níveis ótimos, sendo reforçada a idéia de uma inibição por adição de sódio ao meio de cultivo e no ajuste de pH pós hidrólise.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que todos os parâmetros (temperatura, pressão, DQOp, % de ácido e % de base) analisados exercem influência sobre a hidrólise da biomassa de microalgas. Entretanto, em virtude dos resultados positivos obtidos em tratamentos sem o uso de pressão e visando reduzir os custos de processamento em escala industrial, descartou-se as condições de pressão acima da atmosférica. Existe uma faixa de tempo satisfatória para o processo, assim como uma relação ácido:concentração de DQO particulada que favorece a cinética da reação de hidrólise. Temperatura x DQO particulada, ácido x DQO particulada e ácido e temperatura são as interações que apresentaram os maiores efeitos; entretanto, a interação mais significativa ocorreu entre os fatores ácido e temperatura, independente do tempo de reação.

O pré-tratamento mecânico aumentou o potencial de solubilização da DQO e mostrou-se eficiente, permitindo a redução da temperatura e percentuais de ácido aplicados na hidrólise, reduzindo o custo com reagentes e energia.

A análise das frações solúveis de amostras Controle e hidrolisadas revelou a presença majoritária de carboidratos em comparação à quantidade de proteínas, justificando uma maior produção de metano nas condições com maior concentração de carboidratos.

Condições mais brandas de hidrólise apresentaram um melhor resultado, sendo a melhor condição estabelecida em 40°C com adição de 0,2% de ácido por 16 horas, produzindo volumes de metano de 16,4 mL/gSVT.

A amostra de biomassa não lavada produziu 5,0 mL/gSVT de metano, enquanto a amostra lavada produziu 13 mL/gSVT, confirmando a eficiência do método de lavagem da biomassa. A determinação de concentrações de sódio na amostra revelou a ocorrência de concentrações inibitórias para o processo de digestão anaeróbia. A diminuição do volume de biogás, verificada nos três contatos subsequentes no primeiro planejamento experimental com biomassa após hidrólise ácida, pode estar relacionada a elevadas concentrações de sódio acumuladas nos frascos dos ensaios de biodegradabilidade.

Trabalhos futuros podem investigar mais detalhadamente as concentrações inibitórias de sódio e seu efeito sobre contatos sucessivos da amostra com um mesmo lodo, além de determinar novas técnicas para ajuste de pH após a hidrólise ácida. Outros métodos de digestão como a batelada alimentada podem ser testados, visando aumentar a eficiência do processo.

Experimentos com lodo adaptado poderiam ser conduzidos, no intuito de minimizar os efeitos nocivos da elevada concentração de sódio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. L.; MAT YASIN, N. H.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. Renewable Sustainable Energy Review. 15, pp. 584-593, 2011.

ANDRADE, M. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de Spirulina. Química Nova. 31(8), 2008.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Termophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. Applied Microbiology Biotechnology. 38, pp. 560-564, 1993.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Anaerobic termophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. Water Resource. 28, pp. 727-731, 1994.

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Review Environmental Science Biotechnology. 3, pp. 117–129, 2004.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 21ª Edição. Washington DC, 2005.

BARCZA, M. V. Processos unitários orgânicos. Notas de aula. Escola de engenharia de Lorena, USP, SP, 2010.

BECKER, E. W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (editors). Micro-algal Technology. Cambridge University Press, pp. 222-256, 1988.

BICH, N. N.; YAZIZ, M. I.; BAKTI, N. A. K. Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. Water research. 33 (10), pp. 2357-2362, 1999.

BONMATI, A.; FLOTATS, X.; MATEU, I.; CAMPOS, E. Study of termal hydrolisys as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. Water Science Technology. 44(4), pp. 109-116, 2001.

BOUGRIER, C.; ALBASI, C.; DELGENÈS, J. P.; CARRÈRE, H. Effect of ultrasonic thermal and ozone pretreatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. Chemical Engineering Process. 45, pp. 711-718, 2006.

BOROWITZKA, M. A. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: Cohen Z, editor. Chemicals from microalgae. Taylor e Francis, p. 313–352, 1999.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 12, pp. 542–552, 2008.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. Introdução à Engenharia Ambiental. 2ª ed. São Paulo: Prentice Hall, 2005.

BRAUN, R.; HUBER, P.; MEYRATH, J. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. Biotechnology. Letters. 3, pp. 159-164, 1981.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews.14, 2ª ed., pp. 557-577, Fevereiro, 2010.

BRIAND, X. & MORAND, P. Anaerobic digestion of Ulva sp. 1. Relationship between Ulva composition and methanisation. Journal of Applied Phycology. 9, pp. 511-524, 1997.

BROWN, M. R.; GARLAND, C. D.; JEFREY, S. W.; JAMESON, I. D.; LEROI, J. M. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis sp*. (clone T-Iso), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. Journal Applied Phycology. 5, pp. 285-296, 1993.

BROWN, L. M. e ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. Energy Conversion and Management, 34, pp. 1005-10013, 1993.

BRUHN, A.; DAHL, J.; NIELSEN, H. B.; NIKOLAISEN, L.; RASMUSSEN, M. B.; MARKARGER, S.; OLESEN, B.; ARIAS, C. JENSEN, P. D. Bioenergy potencial of *Ulva lactuca*: biomass yield, methane production and combustion. Bioresource Technology. 102, pp. 2595-2604, 2011.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CAMIRO-VARGAS T. K.; HERNÁNDEZ-AYON J. M.; VALENZUELA-ESPINOZA E.; DELGADILLO-HINOJOSA F.; CAJAL-MEDRANO R. Dissolved inorganic carbono uptake by *Rhodomonas sp*. and *Isochrysis aff. galbana* determined by a potentiometric technique. Aquacultural Engineering. 33, pp. 83–95, 2005.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. Ciência Rural, Santa Maria, 40 (2), pp. 339-347, 2010.

CANTRELL, K. B.; DUCEY, T.; RO, K. S.; HUNT, P. G. Livestock waste to bioenergy generation opportunities. Bioresource Technology. 99, pp. 7941-7953, 2008.

CARDOZO, K. H. M; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.146. p. 60 – 78, 2007.

CARVER, S. M.; HULLAT, C. J.; THOMAS, D. N.; TUOVINEN, O. H. Thermophilic anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H_2 production. Biodegradation. 22, pp. 805-814, 2011.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biodiesel production. Renewable and Sustaintable Energy Reviews 16, pp. 1462-1476, 2012.

CHEN, P. H.; Factors influencing methane fermentation of micro-algae. PhD Thesis, University of California, Berkeley, CA, USA, 1987.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. Bioresource Technology. 99, pp. 4044-4064, 2008.

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

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores anaeróbios. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. 5, 2ª ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 2007.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. Bioresource Technology. 101, pp. 3097–3105, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25, pp. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends Biotechnology. 26, pp. 121-131, 2008.

CHUANG, Y. S.; LAY, C. H.; SEN, B.; CHEN, C. C.; GAPALAKRISHNAN, K.; WU, J. H.; LIN, C. S.; LIN, C. Y. Biohydrogen and biomethane from water hyacinth (*Eichhornia crassispes*) fermentation: effects of substrate concentration and incubation temperature. International Journal Hydrogen Energy. 36, pp. 14195-14203, 2011.

CIRNE, D. G.; PALOUMET, X.; BJÖRNSSON, L.; ALVES, M. M.; MATTIASSON, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste-effects of lipid concentration. Renewable Energy 32, pp. 965-975, 2007.

COONEY, M.; MAYNARD, N.; CANNIZZARO, C.; BENEMANN, J. Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. Bioresource Technology. 98, pp. 2641–2651, 2007.

COSTA, J.A.V; MORAIS, M.G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. Bioresource Technology. 102, pp. 2–9, 2011.

COSTA, J.; SANTANA, F.; ANDRADE, M.; LIMA, M.; FRANCK, D. Microalga biomass and biomethane production in the south of Brazil. Journal of Biotechnology, 136S, S402-S459, 2008.

DAMASCENO, F. R. C.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 95, pp. 241–246, 2012.

DENG, X. LI, Y. FEI, X. Microalgae: A promissing feedstock for biodiesel. African Journal of Microbiology Research. 3 (13), pp. 1008-1014, 2009.

DERNER, R. B. Efeitos de distintas fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* (classe Bassillariophycea), com ênfase no teor de ácidos graxos saturados e poli-insaturados. Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Florianópolis, 138 f., 2006.

De SCHAMPHELAIRE, L., VERSTRAETE, W. Revival of the biological sunlight-to biogas energy conversion system. Biotechnology Bioengineering. 103, pp. 296–304, 2009.

DISMUKES, G. C.; DAMIAN, C.; BENNET, N.; ANANYEY, G.M.; POSEWITZ, M. C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. Current Opinion in Biotechnology, v. 19, p. 235-240, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method fordetermination of sugars and related compounds. Analytical Chemistry. 28 (3), pp. 350-356, 1956.

EHIMEN, E. A.; CONNAUGHTON, S.; SUN, Z.; CARRINGTON, C. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. GCB Bioenergy 1, pp. 371-881, 2009.

ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. 3ª ed., Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2011.

FALKOWSKI P.G.; RAVEN J.A. Aquatic Photosynthesis: Second Edition published by Princeton University Press and copyrighted, 2007.

FRANCK, D. T.; LIMA, M. B.; BORGES, J. A.; ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Crescimento de *Chlorella* e *Spirulina* em efluente da produção de biogás. In: VIII MPU - Mostra da Produção Universitária, 2009, Rio Grande, 2009.

FEEMA. Manual do meio ambiente: métodos FEEMA. Rio de Janeiro, 1983.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J. Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. Applied Microbiology. 7, pp. 219–227, 1959.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic digestion of algae. Applied Microbiology. 5, pp. 47–55, 1957.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition. In: Richmond, A. (editor) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Wiley-Blackwell, 2004.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. New York. Plenum. pp. 29-60, 1975.

GUNASEELAN, V. N. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. Biomass and Bioenergy. 13, pp. 83-114, 1997.

HALLEUX, H.; LASSAUX, S.; RENZONI, R.; GERMAIN, A. Comparative life-cycle assessment of two biofuels ethanol from sugar beet and rapeseed methyl ester. International Journal of Life Cycle Assessment. 13 (3), pp. 184-190, 2008.

HARRIS, R. F.; ADAMS, S. S. Determination of the carbon-bound electron composition of microbial cells and metabolites by dichromate oxidation. Applied Environmental Microbiology. 37, pp. 237-243, 1979.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. Journal of Chemical Technology Biotechnology. 85, pp. 199-203, 2010.

HARUN, R.; JASON, W. S. Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M. K. Exploring pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. Applied Energy. 88, pp. 3464-3467, 2011.

HEANEY-KIERAS, J.; CHAPMAN, D. J. Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga *Porphyridium cruentum*. Carbohydrate research. 52, pp. 169-177, 1976.

HENRARD, A. S. A. Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. Dissertação de Mestrado, FURG, Brasil, 2009.
HENRARD, A. S. A.; MEZA, L. H. R.; BORGES, J. A.; ROSA, G. M. ANDRADE, M. R.; OGRODOWSKI, R.; COSTA, J. A. V. Produção de biogás a partir de biomassa microalgal. Anais do III Congresso de Carvão Mineral, Gramado, RS, 2011.

HENRIKSON, R. Microalga Spirulina: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. Bioresource Technology, 2012.

HUANG, G.; CHEN, F.;WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechology. Applied Energy. 87, pp. 38-46, 2010.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A.. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysis and engineering. Chemical Review. 106, pp. 4044-4098, 2006.

JUNIOR, W. E. F. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. Anais do 28º Encontro de Debates dobre o Ensino de Química, Canoas, RS. 29, pp. 8-13, 2008.

KEEP, U.; MACHENBACH, I.; WEISZ, N.; SOLHEIM, O. E. Enhanced stabilization of sewage sludge through thermal hydrolysis – three years of experience with full scale plant. Water Science Technology. 42 (9), pp. 89-96, 2000.

KOSTER, I. W.; LETTINGA, G. Anaerobic digestion at extreme ammonia concentration. Biological Wastes. 25, pp. 51-59, 1988.

KUGELMAN, I. J.; McCARTY, P. L. Cation toxicity and simulation in anaerobic waste treatment. I. Slug feed studies. Journal of the Water Pollution Control Federation. 37, pp. 97-116, 1965.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. Energy Conversion and Management. 36 (6-9), pp. 689-692, 1995.

KURANO, N.; MIYACHI, S. Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. Journal of Bioscience and Bioengineering. 100, 4ª ed., pp. 403-408, 2005.

LAKANIEMI, A. M.; HULATT, C. J.; THOMAS, D. N.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. Biotechnology for Biofuels. 4 (34), 2011.

LAKANIEMI, A. M.; INTIHAR, V. M.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Growth of *Dunaliella tertiolecta* and associated bacteria in photobioreactors. Microbial Biotechnology. 39, pp. 1357 – 1365, 2012.

LAKANIEMI, A. M.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers – a review. Bioresource Technology. 135, pp. 222-231, 2013.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way for wards. Biotechnology Advances. 30, pp. 673-690, 2012.

LARDON, L.; HÉLIAS, A.; SIALVE, B.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae. Environmental Science e Technology. 43 (17), pp. 6475-6481, 2009.

LEE, R. E. Phycology. Cambridge University Press. Cambridge. 4ª ed., pp. 484-500, 2008.

LI, M.; HU, C. W.; ZHU, Q.; CHEN, L.; KONG, Z. M.; LIU, Z. L. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). Chemosphere. 62, pp. 565-572, 2006.

LI, Y. Y.; SASAKI, H.; YAMASHITA, K.; SEKI, K.; KAMIGOCHI, I. High-rate methane fermentation of lipid-rich food wastes by a high-solids co-digestion process. Water Science Technology. 45 (12), pp. 143-150, 2002.

LIU, C. P.; LIN, L. P. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. 207 Botanical Bulletin of Academia Sinica. 42, pp. 207-214, 2001.

LIU, Z. Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology. 99, pp. 4717-4722, 2008.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potencial for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology. 18 (4), pp. 160-167, 2000.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – São Carlos: RiMa, 2006.

LOURENÇO, S. O. Variação da Composição Bioquímica de Microalgas Marinhas em Cultivo, com Ênfase nos Efeitos da Disponibilidade do Elemento Nitrogênio. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica. USP, São Paulo, Brasil. 1996.

LOVLEY, D. R. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nature Reviews. Microbiology. 4 (7), pp. 497-508, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193, pp. 265-276, 1951.

MACHADO, T. W. M. Estrutura química de polissacarídeos e atividade antioxidante de extratos de microalgas marinhas. Dissertação de Mestrado em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. BioMetals 15, pp. 37 –390, 2002.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, 1ª ed., pp. 217-232, Janeiro, 2010.

McCARTHY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals. Public Works 95 (9), pp. 91-99, 1964.

McCARTY, P. L. Salt Toxicity in anaerobic digestion. Journal (Water Pollution Control Federation). 33 (4), pp. 399-415, 1961.

MIAO, X. L.;WU, Q. Y. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. Journal of Biotechnology. 110, pp. 85-93, 2004.

MIURA, Y.; OHTA, S.; MANO, M.; Miyamoto, K. Isolation and characterization of a unicelular marine green alga exhibiting high activity in dark hydrogen production. Agricultural and Biological Chemistry. 50, pp. 2387-2844, 1986.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F. G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. Journal of Biotechnology. 92, pp. 113- 131, 2001.

MUNIZ, R.N. Educação e biomassa. Anais do 4° Encontro de Energia no Meio Rural, 2002.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water Resource. 40, pp. 2799–2815, 2006.

MUSSGNUG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery system. Journal of Biotechnology. 150, pp. 51-56, 2010.

NEVES, L. C. M. Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. Dissertação de Mestrado. USP, São Paulo, SP, 2003.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering. 20, pp. 459-466, 2003.

OLGUÍN, E. J. The cleaner production strategy applied to animal production. In: OLGUÍN, E. J.; SÁNCHEZ, G.; HERNÁNDEZ, E. (editors) Environmental biotechnology and cleaner bioprocess. London: Taylor and Francis, pp. 227-243, 2000.

OMER, A. M.; FADALLA, Y. Biogas energy technology in Sudan. Renewable Energy. 28, pp.499-507, 2003.

OSWALD, W. J.; GOLUEKE, C. G. Biological transformation of solar energy. Advances in Applied Microbiology. 2, pp. 223–62, 1960.

PARKIN, G. F.; OWEN, W. F. Fundamental of anaerobic-digestion of wastewater sludge. Journal of Environmental Engineering. 112, pp. 867-920, 1986.

PHANG, S. M.; MIAH, M. S.; YEOH, B. G.; HASHIM, M. A. Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. Journal of Applied Physiology. 12 (3), pp. 395-400, 2000.

PIRES, J. C. M.; ALVIM-FERRAZ, F. G.; SIMÕES, M. M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. Renewable and sustainable Energy Reviews. 16, pp. 3043-3053, 2012.

PICARDO, M. C. Desempenho de *Isochrysis galbana* na produção de óleo e sequestro de co2 com fotobiorreator piloto. Tese de Doutorado. UFRJ, RJ, 2012.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology. 102, pp. 17-25, 2011.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science e Technology. 19. pp. 31 – 39, 2008.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. Engineering in Life Sciences. 9, pp. 165-177, 2009.

PULZ, O. Evaluation of GreenFuel's 3D Matrix Algae Growth Engineering Scale Unit: APS Red Hawk Unit AZ. IGV Institut FÜR Getreidevararbeitung Nuthetal, Germany, 2007.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology Biotechnology. 65, pp. 635-648, 2004.

RAS, M.; LARDON, L., SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology. 102, pp. 200-206, 2011.
RATLEDGE, C.; Single cell oils – have they a biotechnological future? Trends in Biotechnology. 11, pp. 278-284, 1993.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Advances in Applied Microbiology. 51, pp. 1-51, 2002.

REVIERS, B. Biologia e Filogenia das Algas. 1ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 2006.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science, Oxford, UK, 2004.

RINZEMA, A.; VAN LIER, J.; LETTINGA, G. Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from UASB reactor. Enzyme and Microbial Technology. 10, pp. 24-32, 1988.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 102, pp. 100–112, 2009.

ROMANO, I., BELLITTI, R., NICOLAUS, B., LICIA LAMA, M., MANCA, M. C., PAGNOTTA, E., GAMBACORTA, A. Lipid profile: a chemotaxonomic marker for classification of a new *cyanobacterium* in *Spirulina* genus. Phytochemistry, 54, 289-294, 2000.

ROSENBERG, J. N.; MATHIAS, A.; KORTH, K.; BETENBAUGH, M. J.; OYLER, G. A. Microlagal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility evaluation. Biomass and Bioenergy. 35, pp. 3865-3876, 2011.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology. 101, pp. 58–64, 2010.

SABOYA, L. V.; MAILLARD, M. B.; LORTAL S. Efficient mechanical disruption of *Lactobacillus heiveticus*, *Lactococcus lactis* and *Propionibacterium freudenreichii* by a new high-pressure homogenizer and recovery of intracellular aminotransferase activity. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 30 (1), pp.1-5, 2003.

SAMSON, R.; LeDUY, A. Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. Biotechnology. Bioengineering. 24, pp. 1919-1924, 1982.

SAMSON, R.; LeDUY, A. Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. Biotechnology Letters. 5, pp. 671-676, 1983.

SAMSON, R.; LeDUY, A. Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. Biotechnology. Bioengineering. 28, pp. 1014-1023, 1986.

SÁNCHEZ, A.; MACEIRAS, R.; CANCELA, A.; PÉREZ, A. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. Applied Energy 101, pp. 192-197, 2013.

SANCHÉZ MIRÓN, A.; GARCIA CAMACHO, F.; CONTRERAS GOMÉZ, A.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricortunum* in quase steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochemical Engineering Journal. 16, pp. 1-5, 2003.

SANCHEZ, E. P.; TRAVIESO, L. Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. Resources Conservation and Recycling. 9, pp. 127-132, 1993.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE, Y.; YOKOYAMA, S-Y. CO_2 fixation and oil production through microalga. Energy Conversion Management. 36, pp. 729-731, 1995.

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. Bioenergy Research. 1, pp. 20-43, 2008.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Biotechnology. 21, pp. 277-286, 2010.

SCRAGG, A. H.; MORRISON, J.; SHALES, S. W. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. Enzyme Microbial Technology. 33, pp. 884 - 889, 2003.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A look back at the U.S. Department of Energy´s Aquatic Species Program – Biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golde, CO, 1998.

SHIRGAONKAR, I. Z.; LOTHE, R. R.; PANDIT, A. B. Comments on the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure and high speed devices. Biotechnology. 14, pp. 657-660, 1998.

SHIRVANI, T.; YANA, X.; INDERWILD, O. R.; EDWARDS, P. P.; KING, D. A.; Life cicle energy and greenhouse gas analysis for algae-derived biodiesel. Energy Environmental Science. 4, pp. 3773-3778, 2011.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P.W. Química inorgânica. 4ª edição, editora Bookman, 2008.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. Biotechnology Advances. 27, pp. 409-416, 2009.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. Bioresource Technology. 102, pp. 10-16, 2011.

SPEECE, R. E. Anaerobic Technology for Industrial Wastewaters. Nashville: Archae press, 1996.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101, pp. 87-96, 2006.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL. V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potencial carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresource Technology.101, pp. 5892-5896, 2010.

SYMONS, G. E.; BUSWELL, A. M. The methane fermentation of carbohydrates. Journal of the American Chemical Society. 55, pp. 2028–36, 1933.

TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M. K. Biomass nutrient profile of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrisis galbana*. Journal of Food Science. 68 (4), pp. 1144-1148, 2003.

TOMASELLI, l. Morphology, ultrastructure and taxonomy of Arthrospira (Spirulina). In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira). Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor e Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

UZIEL, M. Solar energy fixation and conversion with algal bacterial systems. PhD Thesis. University of California, Berkeley, CA, USA, 1978.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrante wastewater from etanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. Water Research. 36, pp. 4185-4192, 2002.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacultural Engineering. 25, pp. 207-216, 2002.

VANDENBROUCKE, M.; LARGEAU, C. Kerogen origin, evolution and structure. Organic Geochemistry. 38, pp. 719-833, 2007.

VASSEUR, C.; BOUGARAN, G.; GARNIER, M.; HAMELIN, J.; LEBOULANGER, C.; LE CHEVANTON, M.; MOSTAJIR, B.; SIALVE, B.; STEYER, J-P.; FOUILLAND, E. Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae-bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. Bioresource Technology. 119, pp. 79-87, 2012.

VON SPERLING, M. Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos. 1. 3ª ed. Belo Horizonte, DESA/UFMG, 2011.

VONSHAK, A. Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor e Francis. p. 233, 1997.

XAVIER, L. D. Recuperação de fósforo a partir da precipitação de estruvita na linha sobrenadante do digestor anaeróbio de lodo. Dissertação de mestrado. UFRJ, RJ, 2012.

YANG, P. F.; ZHANG, R. H.; MEGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. International Journal of Hydrogen Energy. 32, pp. 4761-4771, 2007.

YANG, Z.; GUO, R.; XU, X.; FAN, X.; LI, X. Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. International Journal of Hydrogen Energy. 35, pp. 9618-9623, 2010.

YANG, Z.; GUO, R.; XU, X.; FAN, X.; LUO, S. Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. International Journal of Hydrogen Energy. 36, pp. 3465-3470, 2011.

YAWSON, S. K. LIAO, P. H. LO, K. V. Two-stage dilute acid hydrolysis of dairy manure for nutrient release, solid reduction and reducing sugar production. Natural Resources. 2, pp. 224-233, 2011.

YEN, H. W.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. Bioresource Technology. 98, pp. 130-134, 2007.

YONEDA, N. T. Plâncton. Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná. Pontal do Paraná, PR. 29, 1999.

YUN, Y. S.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C. I.; YANG, J. W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. Journal of Chemical Technology e Biotechnology. 69, pp. 451-455, 1997.

ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. The technol-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. Bioresource Technology. 102, pp. 1149-1158, 2011.

Sites consultados:
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=51696 classificação. Consultado em 17/11/2012.

http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44564&sk=0 classificação. Consultado em 17/11/2012.

8. ANEXOS

ANEXO A

Análise estatística do Planejamento A

Realizou-se uma análise de variância com todas as interações entre os fatores, considerando todas as ordens, se verificando que a curvatura e a interação simultânea dos três fatores não eram estatisticamente significativas, considerando um nível de confiança de 95% (p-level < 0,05). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,99005 e o R^2 ajustado 0,95023. Tais resultados permitem definir que o modelo é capaz de descrever as variáveis em questão; entretanto, o resultado da curvatura mostrou que a região estudada não passa pela região de ótimo para tais fatores.

A Tabela A.1 apresenta a análise de variância sem a interação não estatisticamente significativa (com valor de p > 0,05), no intuito de ajustar os valores. O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,95845 e o R^2 ajustado foi de 0,86151. Apesar da redução dos valores de R^2, observou-se que o modelo implementado descrevia satisfatoriamente o comportamento das variáveis em estudo.

Tabela A.1 – Análise de variância dos resultados do planejamento A sem a interação não significativa.

ANOVA; R-sqr=0,95845; Ajustado: 0,86151					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	390,3	1	390,3	0,0901	0,79237
(1) DQOp (mg/L)	85491,1	1	85491,1	19,73479	0,04711
(2) Temperatura (ºC)	246753,1	1	246753,1	56,96056	0,0171
(3) Ácido (%)	155403,1	1	155403,1	35,8733	0,02676
1*2	82621,1	1	82621,1	19,07228	0,04863
1*3	87990,1	1	87990,1	20,3116	0,04587
2*3	175528,1	1	175528,1	40,5189	0,0238
Lack of fit	27495,1	1	27495,1	6,34698	0,12799
Pure error	8664	2	4332		
Soma Quadrática Total	870336,2	10			

Outra análise que pode ser feita é através do teste F, ou seja, os valores de F calculado, apresentados na Tabela A.1, devem ser comparados com o valor de F tabelado (4,26), de acordo com o número de experimentos e grau de liberdade adotado. A relevância de um fator

é constatada quando o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado, o que se verificou neste estudo.

A fim de legitimar se o modelo se adequava aos dados experimentais, verificou-se a normalidade dos resíduos. A Figura A.1 representa a probabilidade normal dos resíduos, que permite definir como satisfatória a adequação do modelo.

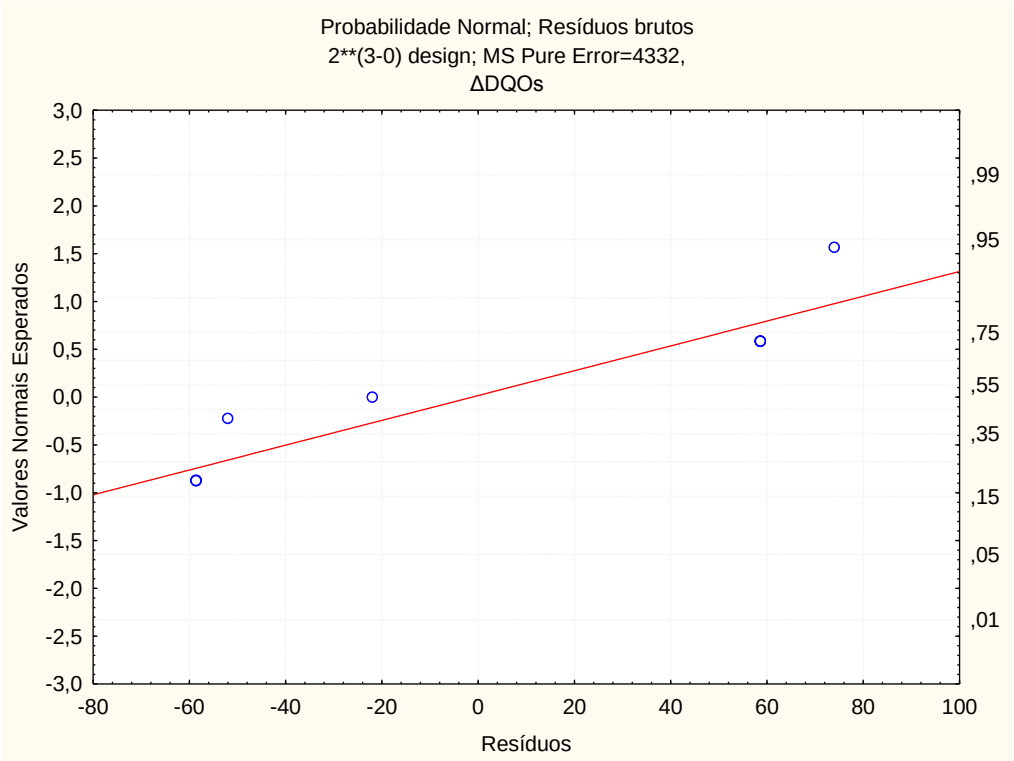

Figura A.1 – Probabilidade normal dos resíduos.

Outro teste realizado no intuito de verificar a adequação do modelo é a homogeneidade da variância, que pode ser observada na Figura A.2. Os resultados sugerem que a variância não apresenta uma distribuição totalmente homogênea.

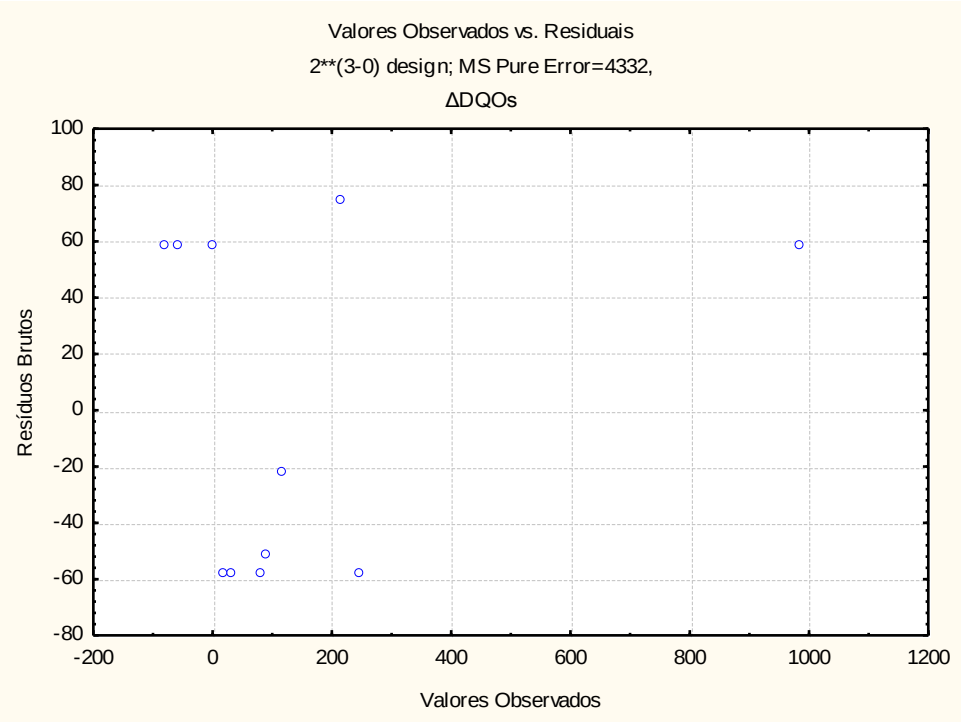

Figura A.2 – Resíduos vs. Valores Observados.

A Figura A.3 apresenta um histograma, com análise quantitativa (Shapiro-Wilk, Kolgomorov-Smirnov) para verificação do modelo através do teste da normalidade dos resíduos. Para que a distribuição seja considerada adequada, o valor de p deve ser maior que 0,05. Considerando-se que o gráfico de probabilidade normal foi satisfatório, pode-se atribuir a baixa representação de distribuição no histograma ao tamanho do *n* amostral.

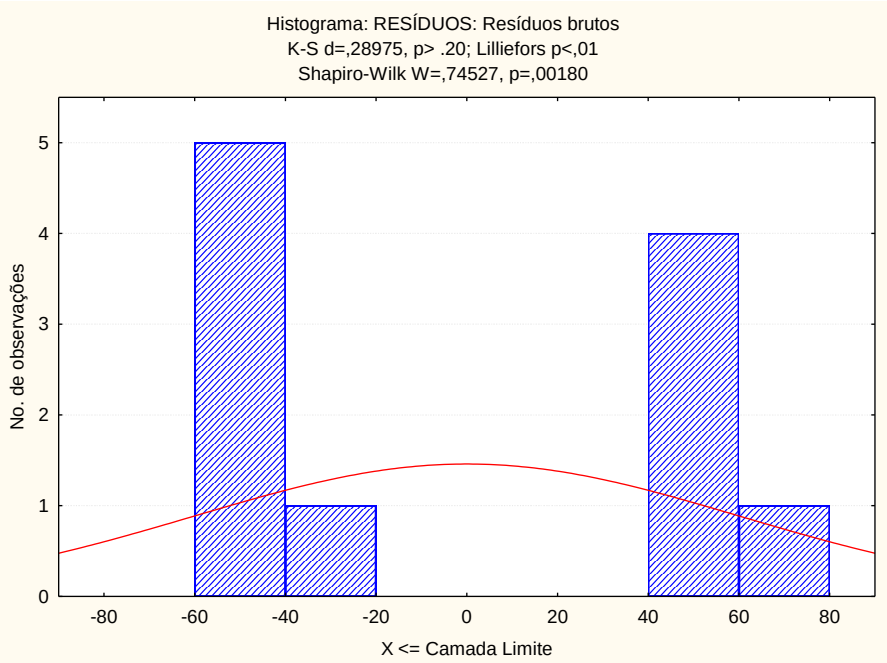

Figura A.3 – Histograma.

A Tabela A.2 ilustra os efeitos estimados, onde é possível concluir que todos os fatores e interações são estatisticamente significativos, com exceção da curvatura e da interação 1*2*3. Foi possível observar pelos valores expressos que todos os fatores, de forma isolada ou combinada, desempenham efeitos positivos.

Tabela A.2 – Efeitos Estimados.

Efeitos estimados; R-sqr=0,95845; Ajustado: 0,86151					
Fatores	Efeito	Pure Error	t(2)	p	Coeficiente
Interseção	154,375	23,2701	6,63403	0,02197	154,375
Curvatura	-26,75	89,1179	-0,30016	0,79237	-13,375
(1) DQOp (mg/L)	206,75	46,5403	4,44238	0,04711	103,375
(2) Temperatura (ºC)	351,25	46,5403	7,54722	0,0171	175,625
(3) Ácido (%)	278,75	46,5403	5,98943	0,02676	139,375
1*2	203,25	46,5403	4,36718	0,04863	101,625
1*3	209,75	46,5403	4,50684	0,04587	104,875
2*3	296,25	46,5403	6,36545	0,0238	148,125

De acordo com a Figura A.4, observa-se que em maiores percentuais de ácido e DQOp ocorre um aumento na solubilização da DQO, embora tais fatores não interajam entre si.

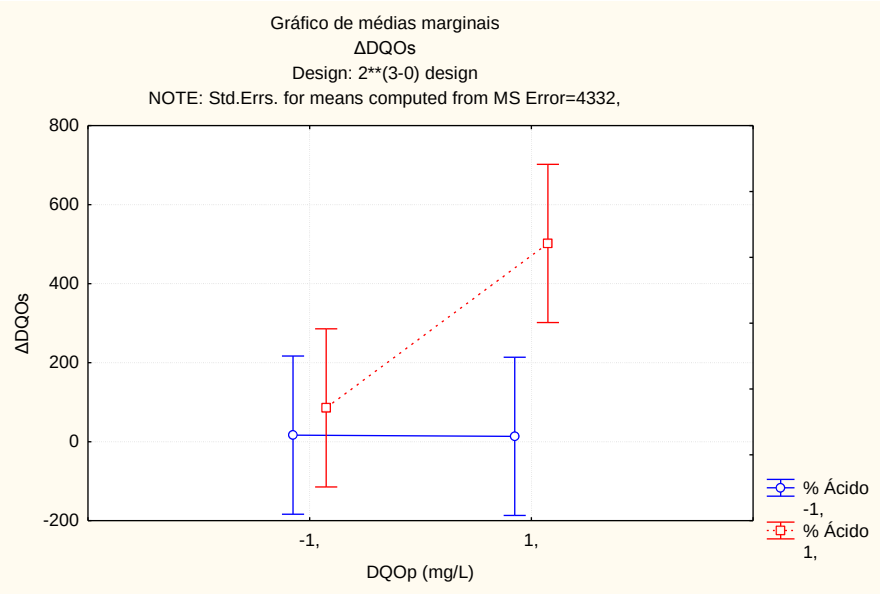

Figura A.4 – Gráfico de médias marginais para DQOp x Ácido.

De acordo com a Figura A.5, observa-se que em temperaturas e DQOp altas ocorre um aumento na solubilização da DQO, embora tais fatores não interajam entre si, conforme o padrão apresentado na figura acima.

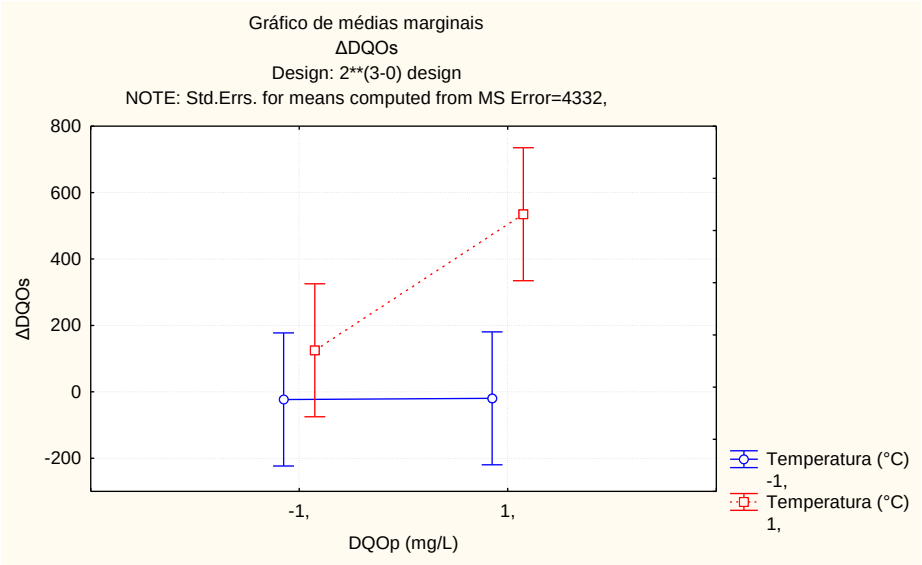

Figura A.5 – Gráfico de médias marginais para DQOp x Temperatura.

Na Figura A.6 é possível notar que em condições mais extremas de ácido e temperatura ocorre uma maior solubilização da DQO e o cruzamento das retas permite assumir uma interação entre os fatores. Soma-se a isso a observação de que ocorre neste caso uma maior inclinação da reta de maior percentual de ácido, mostrando que em associação a elevadas temperaturas, tais fatores são capazes de promover um aumento mais rápido da variável resposta.

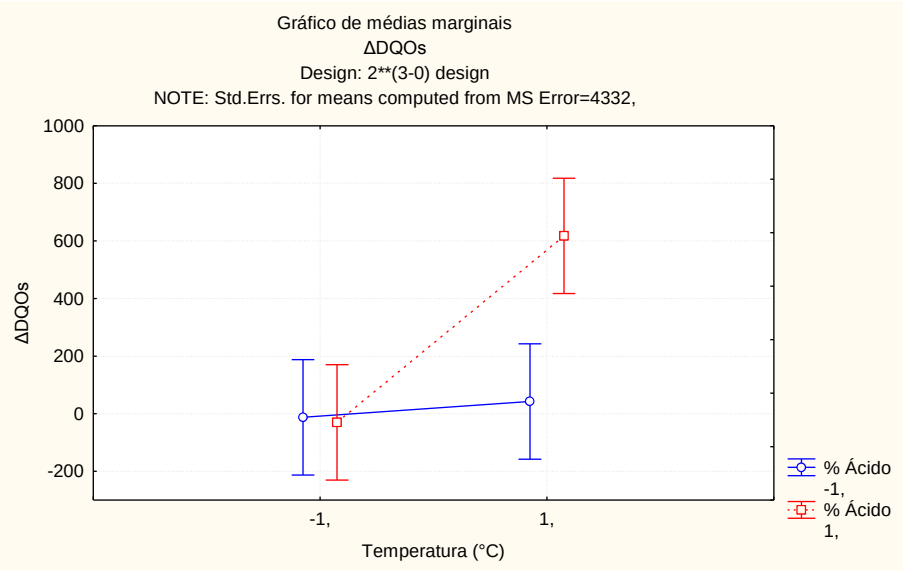

Figura A.6 – Gráfico de médias marginais para Temperatura x Ácido.

ANEXO B

Análise estatística do Planejamento B

A Tabela B.1 apresenta a análise de variância com todas as interações entre os fatores, considerando todas as ordens, do planejamento B. Notou-se que a temperatura e a interação dos fatores temperatura e ácido e dos três fatores não apresentaram significância estatística, considerando um nível de confiança de 95% (p-level < 0,05). O coeficiente de determinação R^2 apresentou o valor de 0,99924 e o R^2 ajustado o valor de 0,99621. Pelos resultados, definiu-se que o modelo seria capaz de descrever as variáveis analisadas. E o resultado da curvatura sugere que a região estudada passa pela região ótima para tais fatores, corroborando a idéia de que condições mais brandas possam vir a dar ótimos resultados na solubilização da DQO.

Tabela B.1 – Análise de variância dos resultados do planejamento B.

ANOVA; R-sqr=0,99924; Ajustado: 0,99621					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	58354,6	1	58354,6	726,046	0,001374
(1) DQOp (mg/L)	123256,1	1	123256,1	1534,309	0,000651
(2) Temperatura (ºC)	666,1	1	666,1	8,292	0,l02406
(3) Ácido (%)	22155,1	1	22155,1	275,79	0,003606
1*2	1711,1	1	1711,1	21,3	0,043881
1*3	4851,1	1	4851,1	60,387	0,016159
2*3	435,1	1	435,1	5,416	0,145406
1*2*3	300,1	1	300,1	3,736	0,192953
Pure error	160,7	2	80,3		
Soma Quadrática Total	211890,2	10			

A Tabela B.2 apresenta a análise de variância após a retirada das interações não estatisticamente significativas (Temperatura x Ácido e DQOp x Temperatura x Ácido) com valor de p > 0,05. O coeficiente de determinação R^2 apresentou o valor de 0,99577 e o R^2 ajustado foi de 0,98943. Os valores de R^2 não sofreram alterações significativas, indicando que o modelo descrevia satisfatoriamente o comportamento das variáveis.

Outra análise que pode ser feita é através do teste F, ou seja, os valores do F calculado, apresentados na Tabela B.2, devem ser comparados com o valor de F tabelado (4,26), de acordo com o número de experimentos e grau de liberdade adotado. A relevância de um fator

é constatada quando seu valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado, o que se verificou neste estudo.

Tabela B.2 – Análise de variância dos resultados do planejamento B após a retirada de termos não significativos.

ANOVA; R-sqr=0,99577; Ajustado: 0,98943					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	58354,6	1	58354,6	726,046	0,001374
(1) DQOp (mg/L)	123256,1	1	123256,1	1534,309	0,000651
(2) Temperatura (ºC)	666,1	1	666,1	8,292	0,l02406
(3) Ácido (%)	22155,1	1	22155,1	275,79	0,003606
1*2	1711,1	1	1711,1	21,3	0,043881
1*3	4851,1	1	4851,1	60,387	0,016159
Lack of fit	735,3	2	367,6	4,576	0,179332
Pure error	160,7	2	80,3		
Soma Quadrática Total	211890,2	10			

A fim de verificar a adequação do modelo aos dados experimentais, observou-se a normalidade dos resíduos. A Figura B.1 apresenta a probabilidade normal dos resíduos, permitindo definir como satisfatória a adequação do modelo.

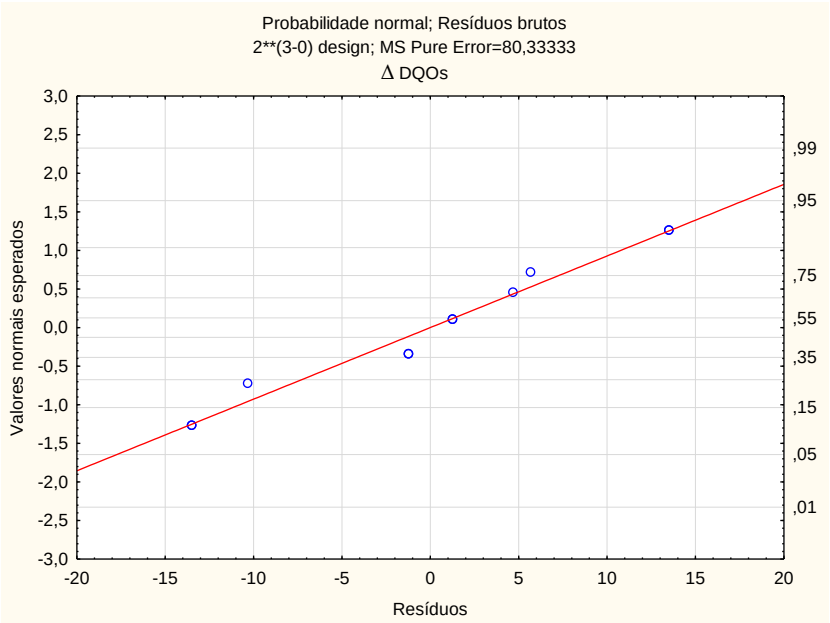

Figura B.1 – Probabilidade normal dos resíduos.

Outro teste realizado no intuito de verificar a adequação do modelo é a homogeneidade da variância, que pode ser observada na Figura B.2. Os resultados sugerem que a variância apresenta uma distribuição totalmente homogênea.

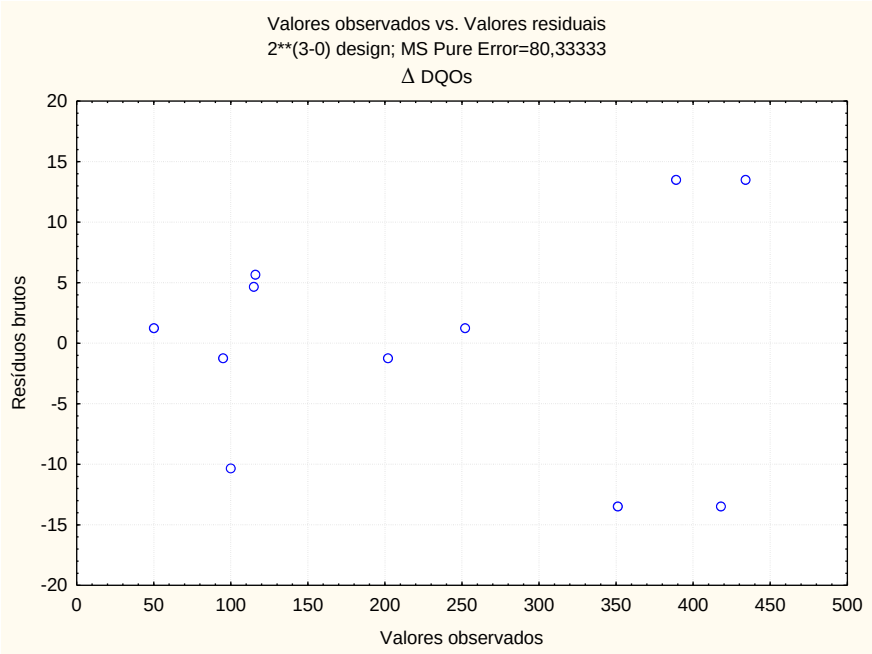

Figura B.2 – Valores Observados vs. Resíduos.

A Figura B.3 apresenta um histograma, com análise quantitativa (Shapiro-Wilk, Kolgomorov-Smirnov), para verificação do modelo através do teste da normalidade dos resíduos. Para que a distribuição seja considerada adequada, o valor de p deve ser maior que 0,05. Através da análise do histograma, considerou-se que a distribuição dos resíduos segue um padrão normal.

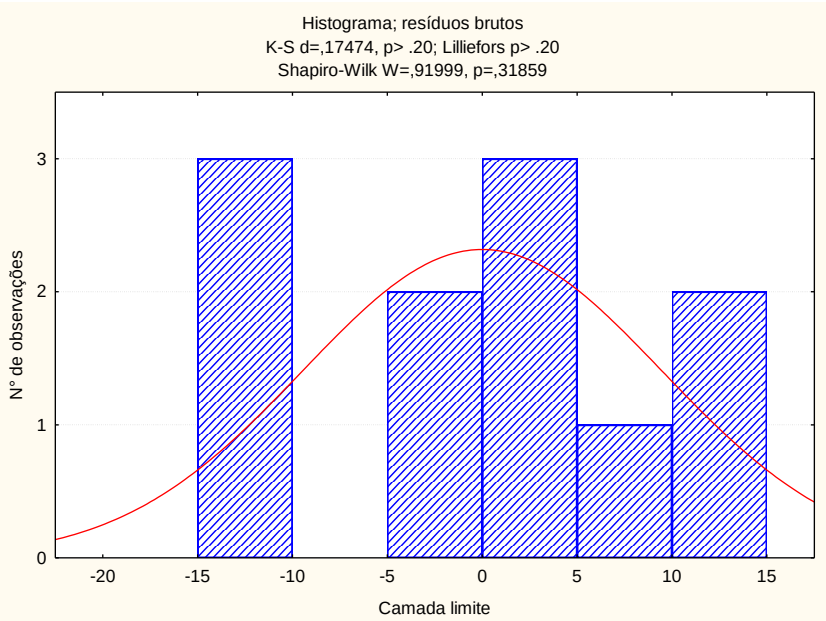

Figura B.3 – Histograma.

A Tabela B.3 ilustra os efeitos estimados, onde é possível concluir que todos os fatores e interações são estatisticamente significativos, com exceção da interação 2*3 e 1*2*3.

Tabela B.3 – Efeitos Estimados.

Efeitos estimados; R-sqr=0,99577; Ajustado: 0,98943					
Fatores	Efeito	Pure Error	t(2)	p	Coeficiente
Interseção	273,875	3,16886	86,427	0,000134	273,875
Curvatura	-327,083	12,13581	-26,9519	0,001374	-163,542
(1) DQOp (mg/L)	248,25	6,33772	39,1703	0,000651	124,125
(2) Temperatura (ºC)	-18,25	6,33772	-2,8796	0,102406	-9,125
(3) Ácido (%)	-105,25	6,33772	-16,6069	0,003606	-52,625
1*2	29,25	6,33772	4,6152	0,043881	14,625
1*3	49,25	6,33772	7,7709	0,016159	24,625

De acordo com a Figura B.4, observa-se que em altas concentrações de DQOp associadas a percentuais baixos de ácido ocorre uma maior solubilização da DQO, embora os fatores não interajam entre si.

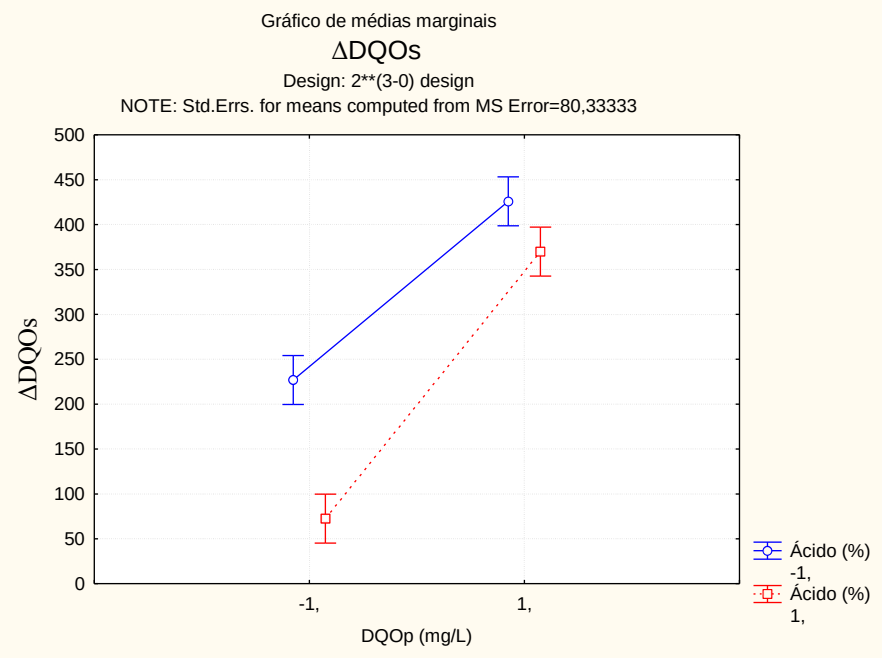

Figura B.4 – Gráfico de médias marginais para DQOp x Ácido

De acordo com a Figura B.5, observa-se que em concentrações de DQOp altas, a diferença na solubilização da DQO quando considerada a temperatura aplicada, é mínima, o que talvez justifique uma redução de temperatura, visando minimizar os custos operacionais. Além disso, nota-se que os fatores descritos anteriormente apresentam interação.

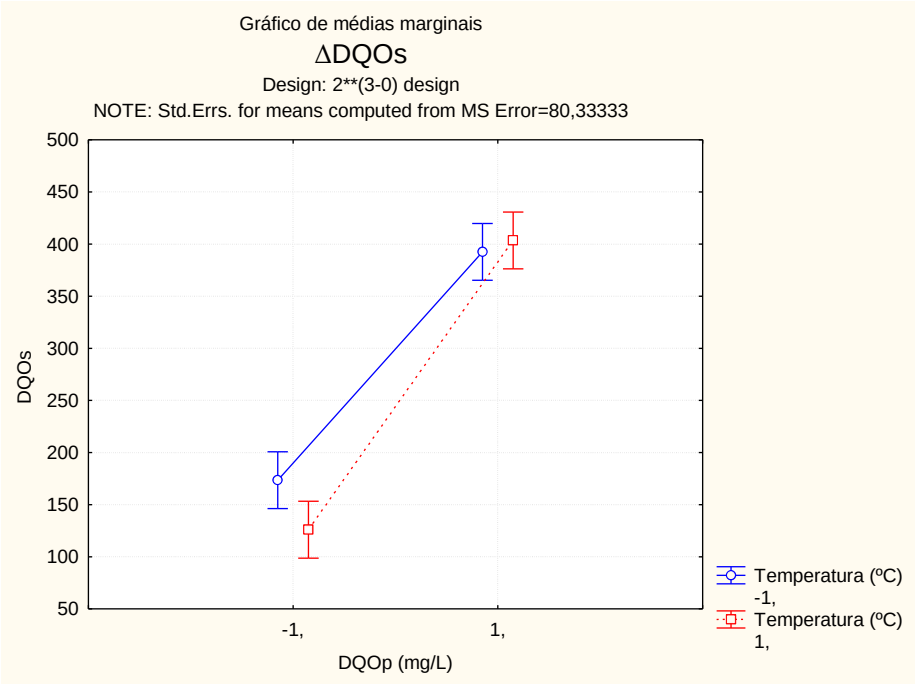

Figura B.5 – Gráfico de médias marginais para DQOp x Temperatura.

A Figura B.6 demonstra que menores percentuais de ácido associados a temperaturas mais brandas resultam em uma maior solubilização da DQO e que estes fatores apresentam interação.

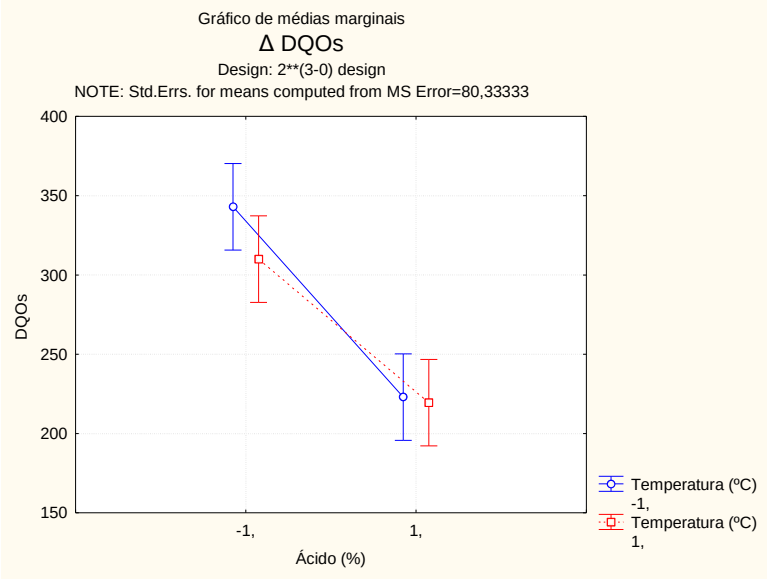

Figura B.6 – Gráfico de médias marginais para Ácido x Temperatura.

ANEXO C

Análise estatística do Planejamento C

Realizou-se uma análise de variância com todas as interações entre os fatores, considerando todas as ordens, de acordo com a Tabela C.1. Notou-se que somente a interação 1*2*3 não foi estatisticamente significativa, considerando um nível de confiança de 95% (p-level < 0,05). O coeficiente de determinação R^2 apresentou o valor de 0,99949 e o R^2 ajustado o valor de 0,99743. Tais resultados permitem definir que o modelo é capaz de descrever as variáveis em questão. O resultado da curvatura mostrou que a região estudada passa pela região do ótimo para tais fatores.

Tabela C.1 – Análise de variância dos resultados do planejamento C.

ANOVA; R-sqr=0,99949; Ajustado: 0,99743					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	738294	1	738294	1941,175	0,000515
(1) DQOp (mg/L)	177310	1	177310	466,197	0,002138
(2) Temperatura (ºC)	30628	1	30628	80,53	0,012191
(3) Base (m/v)	432915	1	432915	1138,252	0,000877
1*2	8001	1	8001	21,037	0,044394
1*3	53956	1	53956	141,865	0,006975
2*3	37675	1	37675	99,058	0,009945
1*2*3	210	1	210	0,552	0,534761
Pure error	761	2	380,3		
Soma Quadrática Total	1479750	10			

A Tabela C.2 ilustra a análise de variância após a retirada da interação não estatisticamente significativa (DQOp x Base x Temperatura), com valor de p > 0,05. O coeficiente de determinação R^2 apresentou o valor de 0,99934 e o R^2 ajustado foi de 0,99781. Os valores de R^2 não sofreram alterações significativas, indicando que o modelo descreve satisfatoriamente o comportamento das variáveis.

Outra análise que pode ser feita é através do teste F, ou seja, os valores do F calculado, apresentados na Tabela C.2, devem ser comparados com o valor de F tabelado (4,26), de acordo com o número de experimentos e grau de liberdade adotado. A relevância de um fator é constatada quando seu valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado, o que se verificou neste estudo.

Tabela C.2 – Análise de variância dos resultados do planejamento C após a retirada de termos não significativos.

ANOVA; R-sqr=0,99934; Ajustado: 0,99781					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	738294	1	738294	1941,175	0,000515
(1) DQOp (mg/L)	177310	1	177310	466,197	0,002138
(2) Temperatura (ºC)	30628	1	30628	80,53	0,012191
(3) Base (m/v)	432915	1	432915	1138,252	0,000877
1*2	8001	1	8001	21,037	0,044394
1*3	53956	1	53956	141,865	0,006975
2*3	37675	1	37675	99,058	0,009945
Lack of fit	210	1	210	0,552	0,534761
Pure error	761	2	380,3		
Soma Quadrática Total	1479750	10			

A Figura C.1 apresenta a probabilidade normal dos resíduos, a fim de verificar a adequação do modelo aos dados experimentais. O alinhamento dos pontos próximos à curva, permitiu definir a adequação do modelo como sendo satisfatória.

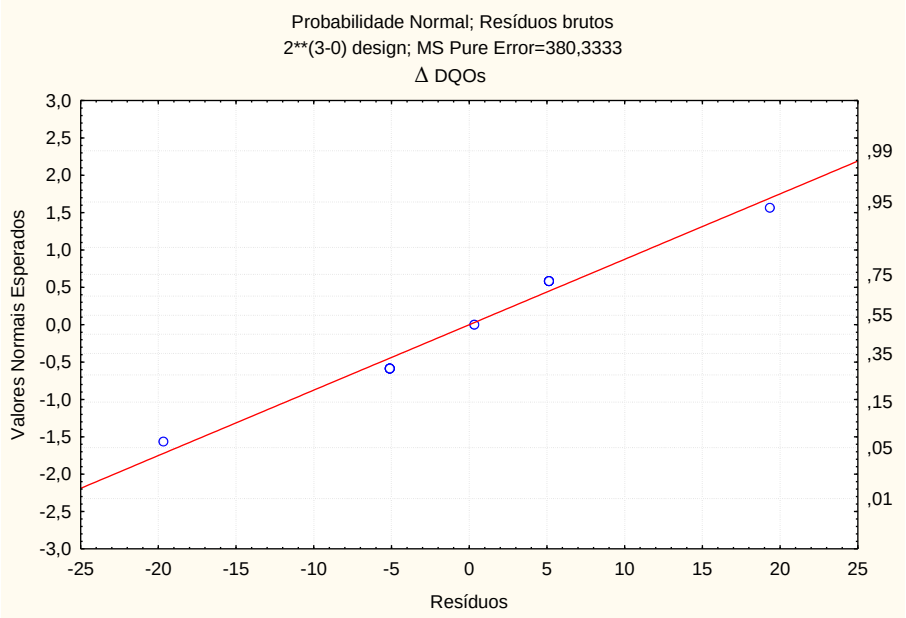

Figura C.1 – Probabilidade normal dos resíduos.

Na Figura C.2 é possível observar a distribuição homogênea dos pontos, o que representa a homogeneidade da variância, indicando a adequação do modelo. Os resultados sugerem que a variância apresenta uma distribuição totalmente homogênea.

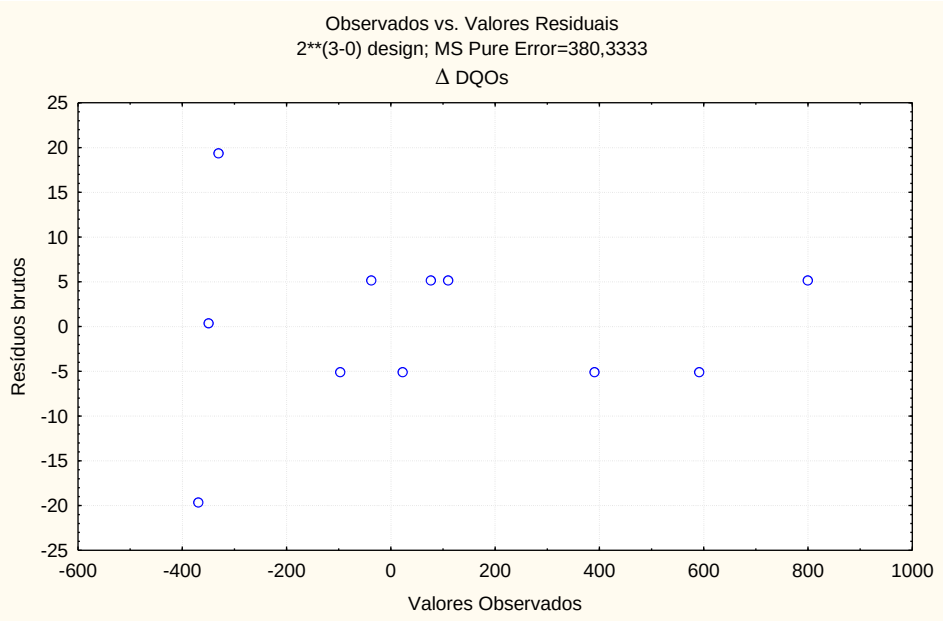

Figura C.2 – Valores Observados vs. Resíduos.

A Figura C.3 apresenta um histograma, com análise quantitativa (Shapiro-Wilk, Kolgomorov-Smirnov), para verificação do modelo através do teste da normalidade dos resíduos. Para que a distribuição seja considerada adequada, o valor de p deve ser maior que 0,05. Através da análise do histograma, considerou-se que a distribuição dos resíduos segue um padrão normal.

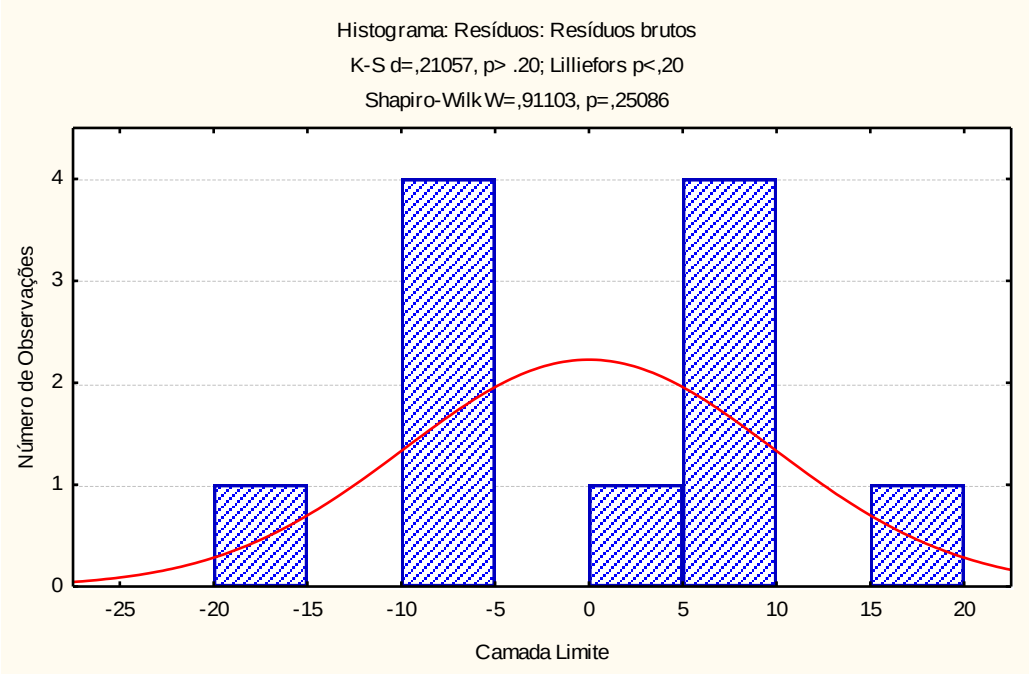

Figura C.3 – Histograma.

A Tabela C.3 apresenta os efeitos estimados, onde é possível concluir que todos os fatores e interações são estatisticamente significativos. Além disso, nota-se que somente a curvatura e a interação DQOp x Temperatura apresentam efeito negativo.

Tabela C.3 – Efeitos Estimados.

Efeitos estimados; R-sqr=0,99934; Ajustado: 0,99781					
Fatores	Efeito	Pure Error	t(2)	p	Coeficiente
Interseção	232,38	6,89505	33,7017	0,000879	232,375
Curvatura	-1163,42	26,40602	-44,0588	0,000515	-581,708
(1) DQOp (mg/L)	297,75	13,79009	21,5916	0,002138	148,875
(2) Temperatura (ºC)	123,75	13,79009	8,9738	0,012191	61,875
(3) Base (m/v)	465,25	13,79009	33,738	0,000877	232,625
1*2	-63,25	13,79009	-4,5866	0,044394	-31,625
1*3	164,25	13,79009	11,9107	0,006975	82,125
2*3	137,25	13,79009	9,9528	0,009945	68,625

De acordo com a Figura C.4, observa-se que a associação de concentrações elevadas de DQOp e Base resulta em valores significativamente superiores, quando comparados às condições mais brandas, embora os fatores não interajam entre si.

Figura C.4 - Gráfico de médias marginais para DQOp x Base

Observa-se na Figura C.5 que, para os fatores DQOp e Temperatura, a interação não ocorre de forma explícita, embora haja uma maior proximidade entre os mesmos. Neste caso,

a concentração de DQOp é a maior contribuinte para um melhor resultado, uma vez que os valores de temperatura utilizados não apresentam uma diferença significativa.

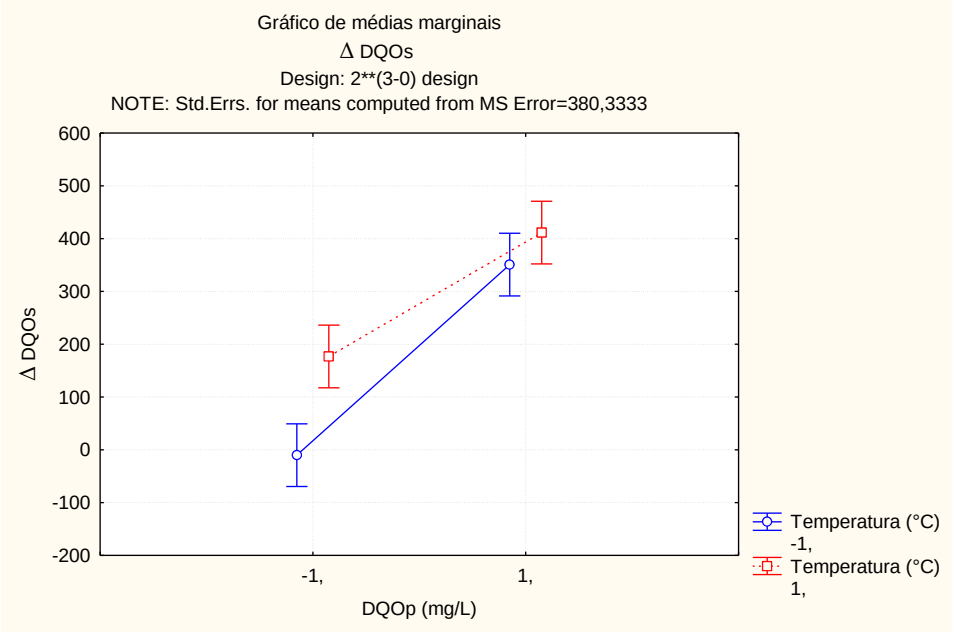

Figura C.5 – Gráfico de médias marginais para DQOp x Temperatura.

A Figura C.6 ilustra a interação existente entre os fatores Base e Temperatura, assim como o fato dos melhores resultados serem obtidos em concentrações mais elevadas de base associadas a temperaturas mais altas.

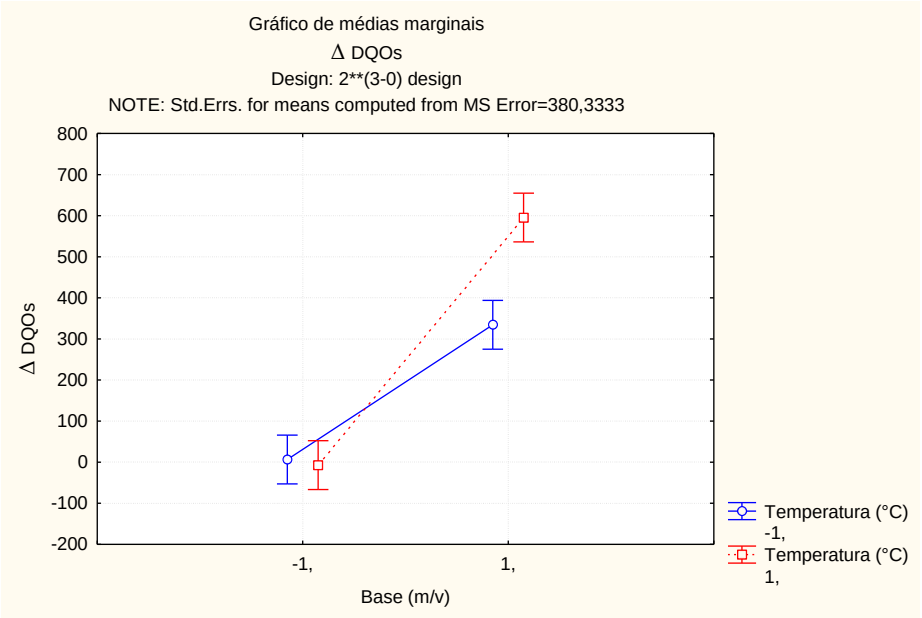

Figura C.6 – Gráfico de médias marginais para Base x Temperatura.

ANEXO D

Análise estatística do Planejamento D

A Tabela D.1 ilustra a análise de variância com todas as interações entre os fatores, considerando todas as ordens. Verificou-se que nenhum fator e interação apresentaram significância estatística, considerando um nível de confiança de 95% (p-level < 0,05). O coeficiente de determinação R^2 apresentou o valor de 0,89281 e o R^2 ajustado o valor de 0,64269. Assim, definiu-se que o modelo não é capaz de descrever as variáveis analisadas.

Tabela D.1 – Análise de variância dos resultados do planejamento D com 16 h.

ANOVA; R-sqr=0,89281; Ajustado: 0,64269					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	331500,1	1	331500,1	12,87162	0,069669
(1) DQOp (mg/L)	184528,1	1	184528,1	7,16494	0,115818
(2) Temperatura (ºC)	33670,1	1	33670,1	1,30736	0,371281
(3) Base (m/v)	105570,1	1	105570,1	4,09912	0,180193
1*2	25200,1	1	25200,1	0,97848	0,426836
1*3	13530,1	1	13530,1	0,52535	0,543895
2*3	528,1	1	528,1	0,02051	0,899257
Lack of fit	31878,1	1	31878,1	1,23778	0,381702
Pure error	51508,7	2	25754,3		
Soma Quadrática Total	777913,6	10			

No intuito de averiguar se a eficiência da hidrólise alcalina para condições mais brandas estaria associada ao tempo de reação, um novo planejamento foi realizado alterando-se o tempo de reação para 24 h. O resultado da análise de variância do novo planejamento pode ser observado na Tabela D.2.

Tabela D.2 – Análise de variância dos resultados do planejamento D com 24 h.

ANOVA; R-sqr=0,97793; Ajustado: 0,88965					
Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	106682,8	1	106682,8	46,16303	0,020983
(1) DQOp (mg/L)	40755,1	1	40755,1	17,63528	0,052296
(2) Temperatura (ºC)	8911,1	1	8911,1	3,85596	0,18854
(3) Base (m/v)	1225,1	1	1225,1	0,53013	0,54226
1*2	2278,1	1	2278,1	0,98577	0,425407
1*3	9453,1	1	9453,1	4,09049	0,180476
2*3	8001,1	1	8001,1	3,46219	0,203855
1*2*3	27495,1	1	27495,1	11,8975	0,074749
Pure error	4622	2	2311		
Soma Quadrática Total	209423,6	10			

Observa-se novamente que nenhum dos fatores, assim como suas interações, demonstram significância estatística. O coeficiente de determinação R^2 apresentou o valor de 0,97793 e o R^2 ajustado o valor de 0,88965. Desta forma, conclui-se que embora os parâmetros analisados não se apresentem significativos, o modelo é capaz de descrever as variáveis analisadas. Além disso, a curvatura neste caso foi estatisticamente significativa, o que sugere que se esteja trabalhando em condições próximas à região mais favorável para o processo.

Trabalhos Apresentados em Eventos

E

Submetidos

13TH WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION: RECOVERING (BIO) RESOURCES FOR THE WORLD

25 a 28 de Junho de 2013 - Santiago de Compostela, Espanha

Hidrólise de biomassa residual de algas visando à produção de metano

N. O. Santos[1], S. M. Oliveira[1], L. C. Alves[2] and M. C. Cammarota[1]

[1] Department of Biochemical Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Centro de Tecnologia, Bl. E, Sl. 203, Ilha do Fundão, 21941-909, Rio de Janeiro, Brazil (E-mail: oliveira_nathalia*@yahoo.com.br*; *suki.morais@gmail.com*; *christe@eq.ufrj.br)*
[2] Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Brazil (E-mail: *larissacalves@yahoo.com.br*)

HIGHLIGHTS

A hidrólise disponibiliza uma maior quantidade de substrato para os micro-organismos, com melhores resultados quando se combinam altas temperaturas e altas porcentagens de ácido. A taxa inicial de produção de biogás foi maior nos experimentos com biomassa hidrolisada. No entanto, após a digestão deste material solubilizado, a produção de biogás estabilizava, provavelmente devido a alguma limitação nutricional.

Keywords
Biomassa de algas; digestão anaeróbia; produção de metano; hidrólise; pré-tratamento.

MAIN TEXT

Recentemente diversas pesquisas têm investigado o potencial das microalgas para o sequestro de CO_2 e geração de biocombustíveis. Para a implementação destes estudos em escala industrial deve-se prever o gerenciamento da biomassa residual. Neste cenário, o tratamento anaeróbio surge como uma tecnologia promissora para a gestão do resíduo, visando o setor econômico e energético (EHIMEN et al., 2009; SIALVE et al., 2009; HARUN et al., 2010; YANG et al., 2010; 2011).

A suspensão de algas, do gênero Isochrysis, foi oriunda de fotobiorreator em escala piloto, sendo caracterizada em termos de: pH (7.4), total COD (3564 mg/L), soluble COD (620 mg/L), BOD_5 (686 mg/L), Volatile total solids (11112 mg/L), Fixed total solids (34011 mg/L), TOC (890 mg/L), Total nitrogen (205 mg/L) and Phosphate (2,6 mg/L), de acordo com procedimentos padrão (APHA, 2005). A elevada concentração de matéria orgânica na forma particulada e a razão COD/BOD_5 indicam a necessidade de uma etapa de hidrólise.

O lodo anaeróbio empregado nos ensaios de biodegradabilidade era oriundo de um reator UASB em operação em indústria de abate de aves. Este lodo se apresentava na forma granular e adaptado a 30ºC, sendo caracterizado em termos de VSS (15.330 mg/L) e armazenado a 4ºC até sua utilização.

Um planejamento estatístico fatorial de ordem 2^3 foi realizado para investigar qual a melhor condição de hidrólise ácida e térmica combinadas, empregando como variáveis a

concentração de DQO particulada (1500, 3000, 4500 mg/L), temperatura (50, 100 e 150ºC) e a concentração de ácido sulfúrico (0, 0.5 e 1.0 % v/v). O tempo de hidrólise foi mantido em 2 h, conforme resultados de testes preliminares. A hidrólise da biomassa foi avaliada através do aumento da DQO solúvel (DQOs) e os resultados obtidos analisados com o programa Statistica 7.0. Verificou-se que diversos fatores e suas interações foram estatisticamente significativos ($p<0,05$) e que melhores resultados foram atingidos quando se combinou altas temperaturas e altas porcentagens de ácido (Figura 1).

Com base nos resultados do planejamento experimental, foram selecionadas três condições que apresentaram melhores resultados na etapa de hidrólise: 150°C/1% ác. (C1), 100°C/1% ác. (C2) e 100°C/0,5% ác. (C3) para os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa juntamente com o Controle (sem hidrólise). Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram conduzidos em triplicata a 30°C por 12 dias, utilizando-se frascos tipo penicilina de 100 mL com 10 mL de headspace, vedados com batoques de borracha e selos de alumínio. O lodo inoculado respeitou a relação DQO inicial: SSV do lodo de 1:1. O pH dos efluentes foi ajustado para 7,0 ± 0,3 antes da mistura com o lodo. Não houve necessidade de suplementação de fósforo e nitrogênio, considerando-se a relação COD:N:P 350:5:1. A produção de biogás foi quantificada através do deslocamento do êmbolo de seringas e sua análise qualitativa foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Micro GC Varian. Os resultados de produção de biogás ao longo do tempo são apresentados na Figura 2.

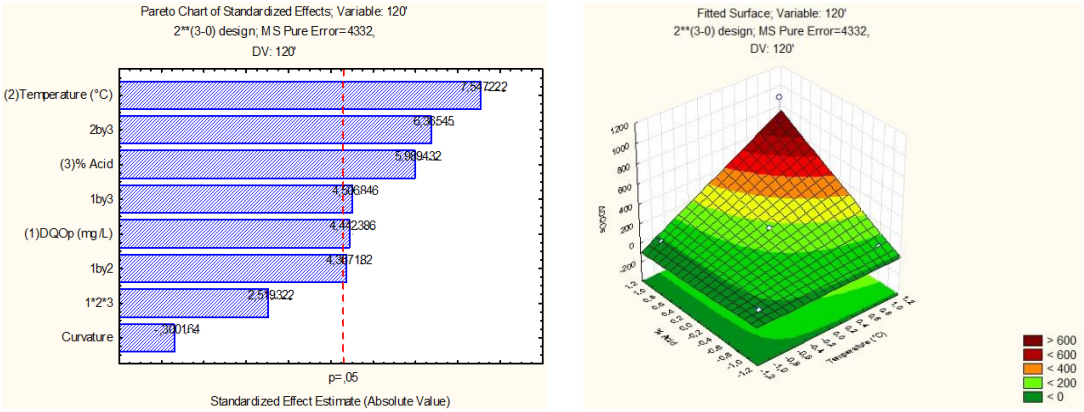

Figure 1. Diagrama de Pareto e superfície de resposta.

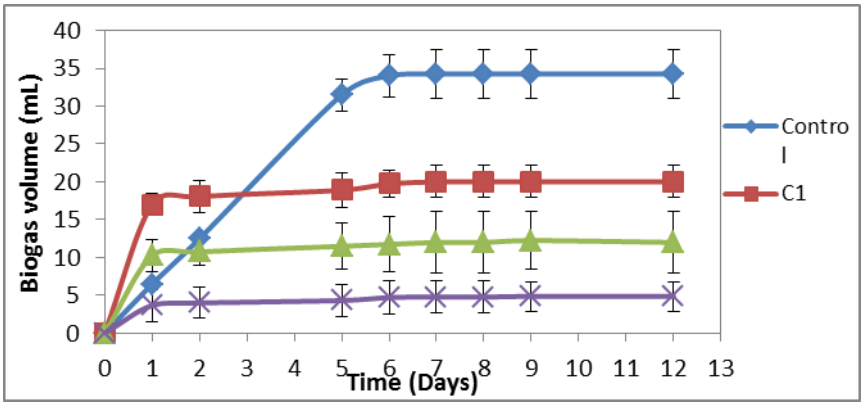

Figure 2. Monitoramento da produção de biogás.

Ao contrário do esperado, a condição Controle apresentou maior volume de biogás (34,2 mL) e percentual de metano (69%) que as condições com hidrólise (4,9 – 20,0 mL, 8-20%). No entanto, a taxa inicial de produção de biogás foi maior nos experimentos com biomassa hidrolisada (10-17 mL/d) que no Controle (6 mL/d), indicando que a hidrólise disponibiliza

uma quantidade maior de substrato para assimilação pelos micro-organismos (DQOs de 1034 e 541 mg/L para C1 e C2) que no Controle (DQOs de 303 mg/L). Após a digestão deste material solubilizado, a produção de biogás estabilizava, provavelmente devido a alguma limitação nutricional. Mais estudos estão sendo conduzidos no intuito de otimizar a etapa de hidrólise de forma a se obter uma melhor produção de metano após condições mais brandas de hidrólise. Estão sendo avaliadas a hidrólise térmica/alcalina e a hidrólise térmica/ácida com tempos maiores.

REFERENCES

APHA. 2005 *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 21st edition, Washington DC.

Ehimen, E. A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington, C. 2009 Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. *GCB Bioenergy* **1**, 371-881.

Harun, R., Danquah, M. K., Forde, G. M. 2010 Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. Journal of Chemical Technology and Biotechnology **85**, 199-203.

Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. 2009 Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustaintable. *Biotechnology Advances* **27**, 409-416.

Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X. 2010 Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy* **35**, 9618-9623.

Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Luo, S. 2011 Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. *International Journal of Hydrogen Energy* **36**, 3465-3470.