

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

FRANCISCA LÍVIA DE OLIVEIRA MACHADO

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MICROALGAS E DE GLICEROL
RESIDUAL DO BIODIESEL**

**FORTALEZA
2012**

FRANCISCA LÍVIA DE OLIVEIRA MACHADO

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MICROALGAS E DE GLICEROL
RESIDUAL DO BIODIESEL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Saneamento Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Stefanutti

Co-orientador: Dr. Alexandre Colzi Lopes

**FORTALEZA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

M131c Machado, Francisca Lívia de Oliveira.
Lívia de Co-digestão anaeróbia de microalgas e de glicerol residual do biodiesel / Francisca
Oliveira Machado – 2012.
108 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Civil, Fortaleza, 2012
Área de Concentração: Saneamento Ambiental.
Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Stefanutti.
Coorientação: Alexandre Colzi Lopes

1. Saneamento. 2. Microalga. 3. Digestão anaeróbia. I. Título.

FRANCISCA LÍVIA DE OLIVEIRA MACHADO

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MICROALGAS E DE GLICEROL
RESIDUAL DO BIODIESEL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil – Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 01/06/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Stefanutti (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dr. Alexandre Colzi Lopes (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Francisco Suetônio Bastos Mota (Examinador interno)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Marcos Erick Rodrigues da Silva (Examinador externo)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE

*Dedico aos meus pais e ao meu
esposo pelo apoio incondicional!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela ajuda, força e por tornar esse sonho realidade.

Aos meus pais por terem me proporcionado o dom da vida e terem me apoiado, incentivado e amado sempre.

Ao meu querido esposo pelo apoio, compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos por acreditarem e torcerem por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Stefanutti, pela orientação e confiança.

Ao meu co-orientador, Dr. Alexandre Colzi Lopes, pela ajuda, orientação e apoio indispensáveis à realização desse trabalho.

Aos professores Francisco Suetônio Bastos Mota e Marcos Erick Rodrigues da Silva por aceitarem participar da banca examinadora.

Aos professores do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas, Natan e Michael Douglas, pela dedicação e ajuda indispensável na realização das análises.

Aos queridos colegas do mestrado: Laiz, Geísa, Gilmar, Edlene, Karina, Ticiania, Patrícia, Ataciso, Geraldo, Isabelly, Raquel, Anna Patricya e demais pelos momentos de descontração, apoio e atividades.

Aos colegas do Labosan: Cristina, Antônio, Carlos Henrique, Fernando Pedro, Rafahel, Bárbara, Clarisse e demais, pelo companheirismo, amizade e ajuda indispensável.

A Petrobrás, por ter cedido amostra para o experimento.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma, contribuíram para o desfecho desse trabalho.

RESUMO

As microalgas, seres microscópicos com capacidade fotossintética, produzem oxigênio na presença de energia luminosa. Devido a isso as microalgas são utilizadas para tratamento de esgotos em lagoas de estabilização, porém essa atividade gera uma grande quantidade de biomassa algal. Tendo em vista a produção dessa biomassa e sua destinação em corpos hídricos provocando efeitos desagradáveis, buscou-se avaliar a reutilização dessa biomassa como substrato para produção de metano a partir da digestão anaeróbia. Devido à presença de uma parede celular rígida, verificou-se a necessidade da aplicação de testes de hidrólise para as microalgas com a finalidade de melhorar sua biodegradabilidade, sendo observado o melhor pré-tratamento aplicado, o térmico por 30 minutos a 120°C e 1 kgf/cm². Para melhorar a relação C/N, utilizou-se o glicerol residual do biodiesel para realização de co-digestão com microalgas. O glicerol residual do biodiesel (1 kg de glicerol para cada 10 kg de biodiesel produzido), além de ser um resíduo impuro, é também produzido em grande escala como subproduto da transesterificação de óleos e gorduras e sem muitas aplicações devido exatamente a presença de impurezas. Foram testadas relações DQO/N de 20 (fase 2), 40 (fase 3) e 70 (fase 4), além da relação apenas das microalgas (fase 1), sendo as COV aplicadas, variando de 0,06 a 0,75 kg/m³.d. Foram utilizados dois reatores semelhantes ao UASB (UASB modificado), nos quais continham microalgas brutas e pré-tratadas, ambos em co-digestão com o glicerol. As remoções de DQO variaram de 40 a 90%. O biogás produzido teve rendimentos de até 73% para o reator degradando microalgas pré-tratadas e 84% para o reator degradando microalgas brutas. Não houve remoções significativas de amônia e sólidos suspensos totais e voláteis, também não foram utilizados macro e micronutrientes, sendo esses nutrientes fornecidos apenas pelas microalgas. O bicarbonato de sódio como tampão foi utilizado apenas na última fase (fase 4), devido a queda do pH para uma faixa não aceitável para digestão anaeróbia, no início dessa fase. As condições de estabilidade foram mantidas, baseadas na relação AGV/Alc, que se manteve em faixas aceitáveis, principalmente para o reator operando microalgas pré-tratadas, sendo observado valores indicativos de instabilidade em algumas fases no reator sem pré-tratamento. Foi realizado teste de atividade metanogênica específica para avaliar o lodo de inóculo quanto a atividade e produção de metano, obtendo-se valor médio de 0,26 g DQO-CH₄/g SSV.d.

Palavras chave: microalgas; digestão anaeróbia; glicerol residual do biodiesel; pré-tratamento.

ABSTRACT

Microalgae, microscopic life forms with photosynthetic capacity, produce oxygen thanks to light energy. Due to this capacity, microalgae are used for sewage treatment in stabilization ponds, however, this activity generates a large amount of microalgal biomass. In view of this excess of biomass production and its disposal in water bodies produces unpleasant effects, it has been evaluated the re-use of this biomass as a substrate for methane production in anaerobic digestion. Since microalgae have a rigid cell wall, the application of microalgae hydrolysis tests was necessary in order to improve its biodegradability. Heat pretreatment for 30 minutes at 120°C and 1 kgf/cm² resulted in the best pretreatment applied. In order to improve C/N ratio, residual glycerol coming from biodiesel production was used to perform co-digestion with microalgae. Residual glycerol coming from biodiesel production (1Kg of glycerol per 10 Kg of biodiesel generated) is an impure residue which is also produced at large scale as a byproduct from the trans-esterification of fats and oils. In fact, the presence of impurities limits its applications. In this study, different COD/N ratios of 20 (phase 2), 40 (phase 3) and 70 (phase 4) were tested and the organic loading rate (OLR) applied ranged from 0,06 to 0,75 kg/m³.d. In the phase 1 only microalgae was used on the influent. Two modified UASB reactors were used. One of them was fed with pretreated microalgae, while the other one was fed with non-pretreated microalgae. Both of them were operated in co-digestion with glycerol. COD removal efficiencies ranged between 40% and 90%. Biogas produced presented values of 73% and 84% for each bioreactor treating pretreated and non-pretreated microalgae, respectively. Neither nitrogen nor ammonia and total and volatile suspended solids was significantly removed. Moreover, microalgae were the sole source of macro and micro-nutrients in this work. Sodium bicarbonate was used as a buffer during the phase 4, since pH fall down enough to harm the anaerobic digestion process at the beginning of phase 4. Based on the maintenance of adequate VFA/Alk ratios, both reactors presented a stable operation, specially the reactors treating pre-treated microalgae. Instability periods were mainly observed in some operation phases in the reactor without pretreatment. Specific methanogenic activity tests were carried out in order to evaluate the quality of the inoculum in terms of activity and methane production. Methane production presented a mean value of 0,26 g DQO-CH₄/g SSV.d.

Keywords: microalgae; anerobic digestion; residual glycerol of biodiesel; pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas metabólicas e micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia ...	19
Figura 2- Biomassa microalgal recuperada do caldo de cultura por filtração.	26
Figura 3 - Simbiose entre bactérias e algas nas lagoas de estabilização	29
Figura 4 - Estrutura química do glicerol.....	34
Figura 5 - Separação de fases após reação de transesterificação para produção de biodiesel.....	35
Figura 6 - Produção de biodiesel e glicerol a partir de óleos e gorduras.....	36
Figura 7 – Frasco utilizado no teste de AME e biodegradabilidade (ANGELIDAK <i>et al.</i> , 2009).....	43
Figura 8 - Fluxograma de etapas para o teste de AME	44
Figura 9- Sistema com frascos reatores para avaliação do teste de AME e biodegradabilidade.....	46
Figura 10 - Esquema de frascos, duplicados, contendo os diferentes substratos	49
Figura 11 - Imagem de satélite da Estação de Tratamento de Esgoto da CAGECE, destacando as Lagoas de Estabilização e a área experimental, Aquiraz, Ceará.	52
Figura 12 - Ponto de coleta do efluente contendo microalgas.....	52
Figura 13 - Reatores utilizados no experimento.....	54
Figura 14 - Frascos de armazenamento dos afluentes (alimentação)	55
Figura 15 - Medidores da vazão de gás utilizados nos reatores	56
Figura 16 - Cromatógrafo gasoso GC 17A – Shimadzu.....	57
Figura 17 - Gráfico de produção de metano e atividade metanogênica específica da glicose.....	62
Figura 18 - Diagrama de Pareto para os dados de produção de metano.....	66
Figura 19 - Gráfico de efeitos principais das variáveis estudadas.....	66
Figura 20 - Eficiências de remoção de DQO total para o R1 e R2.....	73
Figura 21 - Eficiências de remoção de DQO solúvel para o R1 e R2.	74
Figura 22 – Gráficos de valores de DQO’s de entrada e saída, solúvel e total para o R1	75
Figura 23 - Gráficos de valores de DQO’s de entrada e saída, solúvel e total para o R276	
Figura 24 - Gráfico das concentrações afluente e efluente de amônia no R1	79
Figura 25 - Gráfico das concentrações afluente e efluente de amônia no R2	80

Figura 26 - Gráficos de concentração de NTK no afluente e efluente do R1 e R2 respectivamente	82
Figura 27 - Gráfico de concentração de clorofila no afluente e efluente para o R1	86
Figura 28 - Gráfico de concentração de clorofila no afluente e efluente para o R2	87
Figura 29 - Gráfico de percentual de metano em função dos dias corridos para o R1 e R2	89
Figura 30 - Gráfico de percentual de metano em função dos dias em cada fase do experimento para o reator 1	90
Figura 31 - Gráfico de percentual de metano em função dos dias em cada fase do experimento para o reator 2	90
Figura 32 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel nos reatores R1 e R2 da fase 2.	92
Figura 33 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel nos reatores R1 e R2 da fase 3.	93
Figura 34 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel nos reatores R1 e R2 da fase 4.	94
Figura 35 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel das fases 2, 3 e 4 do reator R1.	95
Figura 36 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel das fases 2, 3 e 4 do reator R2.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os tratamentos aeróbios e anaeróbios.....	17
Tabela 2- Reações de oxidação de compostos intermediários da DA.....	21
Tabela 3 - Comparação dos rendimentos de óleo de algumas fontes.....	28
Tabela 4 - Estimativa de produção de metano de espécies de Chlorella, sob diferentes condições de crescimento e teor nutricional das espécies.	31
Tabela 5 - Rendimento de metano a partir de algumas espécies de algas e microalgas. 34	
Tabela 6 - Características do glicerol acidificado, destilado e puro.....	38
Tabela 7 - Concentração da solução de macronutrientes	44
Tabela 8 - Concentrações da solução de micronutrientes.....	45
Tabela 9 - Pré-tratamentos aplicados às microalgas para o teste de biodegradabilidade	48
Tabela 10 - Caracterização do lodo de inóculo	51
Tabela 11 - Dimensões das lagoas utilizadas no experimento.	51
Tabela 12 - Caracterização das microalgas	53
Tabela 13 - Caracterização do glicerol.....	53
Tabela 14 - Condições cromatográficas do GC/TCD utilizadas na análise do biogás no teste de AME	57
Tabela 15- Resumo do experimento de acordo com os substratos utilizados e relações DQO/N.	58
Tabela 16 - Parâmetros monitorados na fase experimental.....	60
Tabela 17 - Planejamento fatorial 2 ² para otimização das condições estudadas.....	65
Tabela 18 - Parâmetros avaliados durante a operação dos reatores	68
Tabela 19 - DQO, total e solúvel, afluyente e efluente e eficiências de remoção.....	72
Tabela 20 - Valores médios de alcalinidade e AGV e relação AGV/ALC	83
Tabela 21 - Valores de SST e SSV obtidos para o afluyente e efluente em ambos os reatores durante a fase experimental	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AF	Afluente
AME	Atividade Metanogênica Específica
ASBR	<i>Anaerobic Sequencing Batch Reactor</i>
A/M	Relação alimento/microrganismo
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AGV/Alc	Relação ácidos graxos voláteis/alcalinidade
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CH₄	Metano
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CO₂	Gás Carbônico
CSTR	<i>Continuous stirred tank reactor</i>
DA	Digestão Anaeróbia
DEHA	Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO_{rem}	Demanda Química de Oxigênio removida
DQO/N	Relação demanda química de oxigênio/nitrogênio
EF	Efluente
ETEs	Estações de Tratamento de Esgotos
ha	Hectares
HCl	Ácido Clorídrico
IC	<i>Internal Circulation</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kg	Quilograma
L	Litros
LABOSAN	Laboratório de Saneamento
Mha	Megahectares
MJ	Megajoules
MO	Matéria Orgânica
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₃	Amônia Livre
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
ORP	<i>Oxidation reduction potential</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
R1	Reator 1
R2	Reator 2
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TCD	<i>Thermal Conductivity Detector</i>
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TDS	<i>Total Dissolved Solids</i>
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
ΔG	Variação de energia livre (J)
ΔG⁰	Variação de energia livre padrão (J)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Digestão Anaeróbia.....	16
3.2 Microalgas	25
3.2.1 Conceitos e Aplicações	25
3.2.2 Microalgas e as lagoas de estabilização	29
3.2.3 Biodegradabilidade das microalgas.....	30
3.3 Glicerol	34
3.4 Testes de atividade metanogênica específica e biodegradabilidade	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Testes de atividade metanogênica específica (AME) e biodegradabilidade.....	42
4.1.1 Atividade Metanogênica Específica.....	43
4.1.2 Teste de biodegradabilidade.....	47
4.2 Inóculo	50
4.3 Substratos.....	51
4.4 Reatores: Configuração e operação	53
4.5 Experimentos em fluxo contínuo	57
4.6 Ensaio	59
4.7 Tratamento estatístico	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Avaliação do teste de atividade metanogênica específica do lodo	62
5.2 Teste de biodegradabilidade	64
5.3 Operação e monitoramento dos reatores em escala laboratorial.....	67
5.3.1 Parâmetros operacionais dos reatores durante as fases estudadas.....	67
5.3.2 Demanda química de oxigênio	69
5.3.3 NH ₃ e NTK.....	77

5.3.4 Alcalinidade e AGV	83
5.3.5 Sólidos suspensos totais e voláteis.....	84
5.3.6 Clorofila A.....	86
5.4 Concentração de metano no biogás	88
5.5 Influência do pré-tratamento na remoção de DQO.....	91
5.5.1 Fase 2.....	91
5.5.1 Fase 3.....	92
5.5.1 Fase 4.....	93
5.6 Influência da relação DQO/N na remoção de DQO	94
5.6.1 Reator R1.....	94
5.6.1 Reator R2.....	95
6 CONCLUSÕES	97
7 RECOMENDAÇÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

Diversas atividades desenvolvidas pelo homem incluem a utilização de água, um bem necessário a todos os aspectos da vida. O fato é que a utilização de água gera esgoto que posteriormente necessita de tratamento antes de ser devolvido ao meio ambiente. Atualmente existe uma gama de tecnologias de tratamento de esgoto (lodos ativados, filtros anaeróbios, reatores UASB, etc.), até mesmo tratamentos que atendem a particularidades climáticas de uma determinada região, como é o caso das lagoas de estabilização.

As lagoas de estabilização são tanques de grandes dimensões e pequenas profundidades onde o esgoto flui constantemente sendo tratado por processos naturais. No Nordeste Brasileiro, principalmente no Estado do Ceará, a utilização de lagoas de estabilização tem ganhado ampla proporção (SILVA, SILVA, 1999), isso ocorre devido às condições climáticas favoráveis (temperatura e insolação elevadas), além desse sistema ser de operação simples e utilização de pouco ou nenhum equipamento (VON SPERLING, 1986). O efluente gerado do tratamento em lagoas de estabilização apresenta boa qualidade quanto à remoção de matéria orgânica.

Ocorre nessas lagoas uma variedade de micro-organismos essenciais para o processo de tratamento. Dentre eles, encontram-se as microalgas e as bactérias. As microalgas promovem o suprimento de oxigênio para as bactérias aeróbias e facultativas, as quais degradam a matéria orgânica a partir da respiração, liberando gás carbônico para ser consumido pelas algas. Esse processo ocorre de maneira simbiótica.

Dentre as variantes de lagoas de estabilização estão as lagoas de alta taxa, que são lagoas com grande produção de algas, remoção de nutrientes e organismos patogênicos. Embora essas lagoas apresentem boa eficiência na remoção de elementos indesejáveis, a elevada produção de biomassa algal ocasiona diversos problemas, entre eles, consumo de oxigênio, cor e turbidez nos corpos receptores. Além disso, algumas espécies de microalgas apresentam elevada toxicidade.

Alguns estudos têm buscado soluções de remoção e reaproveitamento dessas microalgas para mitigar os problemas citados. Dentre as soluções mais

promissoras, está a produção de metano a partir da fração orgânica da biomassa microalgal por processo de digestão anaeróbia. Esse processo de tratamento apresenta inúmeras vantagens, dentre as quais: viabilidade econômica, por não exigir gastos energéticos demasiados; menor geração de resíduos que os processos aeróbios; produção de energia a partir do metano.

São diversas as aplicações de microalgas, incluindo a produção de biodiesel após a extração de lipídios. As microalgas provenientes da transesterificação também podem ser degradadas anaerobiamente, como mostram alguns experimentos já realizados (EHIMEN *et al.*, 2009; SIALVE *et al.*, 2009), conferindo à biomassa um caráter ainda mais renovável.

O processo de produção de biodiesel gera também o glicerol, um produto com bastante aplicabilidade, sendo utilizado como matéria-prima na fabricação de produtos farmacêuticos, alimentícios e de higiene oral, dentre outros (ROBRA, 2006), porém necessitando de certo grau de pureza, o que não se observa no glicerol residual proveniente da produção de biodiesel. O glicerol residual proveniente da produção de biodiesel é gerado em grandes quantidades, sendo considerada a produção de 10 kg de glicerol impuro (55-90%) para cada 100 kg de biodiesel produzido (HAZIMAH *et al.*, 2003 apud SILES LÓPES *et al.*, 2009). Com o constante crescimento da indústria de biodiesel, é gerado um excedente de glicerol bruto que ocasiona problemas ambientais associados à eliminação desse produto, visto que o glicerol residual do biodiesel não apresenta viabilidade quanto à venda. Dessa forma, tendo em vista a natureza reduzida de carbono no glicerol, o processo anaeróbio torna-se uma alternativa para geração de metano a partir do glicerol residual do biodiesel, convertendo quantidades de glicerol a preços reduzidos em produto de valor agregado, tornando mais viável a produção de biodiesel (YAZDANI, GONZALEZ, 2007).

Neste trabalho são mostrados os efeitos do pré-tratamento aplicado ao efluente de lagoa de estabilização (microalgas), bem como os efeitos da adição do glicerol residual do biodiesel na co-digestão anaeróbia com microalgas, tendo em vista melhorar a biodegradabilidade das microalgas frente à parede celular rígida que estas possuem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do pré-tratamento aplicado às microalgas provenientes de lagoa de estabilização na co-digestão anaeróbia com glicerol residual do biodiesel.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o melhor pré-tratamento a ser aplicado às microalgas para potencializar sua degradação e produção de metano;
- Estudar os efeitos do pré-tratamento e da co-digestão na biodegradabilidade de microalgas;
- Avaliar o efeito das relações DQO/N na co-digestão anaeróbia de microalgas e glicerol residual do biodiesel;
- Avaliar o efeito do suplemento nutricional (micronutrientes, macronutrientes e alcalinidade) proveniente das microalgas de lagoa de estabilização no consórcio microbiano anaeróbio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Digestão Anaeróbia

O processo de digestão anaeróbia é um dos mais antigos métodos utilizados para estabilizar a matéria orgânica. A digestão anaeróbia tem tradicional aplicabilidade em digestão de lodo para destinação final, porém atualmente essa tecnologia tem tomado grandes dimensões no tratamento de águas residuárias domésticas e industriais (ALBUQUERQUE, 2009).

Segundo Nogueira (1986) (apud PINTO, 1999), o processo de digestão anaeróbia é conhecido desde o século XVIII, quando foi descoberto pelo químico italiano Alessandro Volta, onde o mesmo identificou o metano no gás dos pântanos, o qual era proveniente da decomposição de resíduos vegetais em ambientes anaeróbios. Alessandro também verificou que o gás metano apresentava características combustíveis. O químico escreveu sobre a formação de “*Aria inflammabile Nativa delle Paludi*” (gás inflamável), que foi publicado em 1776 na Itália. Posteriormente, a comunidade científica reconheceu sua descoberta, após a tradução de seus escritos para o alemão. (WELLINGER, 1999).

Reichert (2005) cita, a respeito da digestão anaeróbia, que “os primeiros relatos remontam ao século X a.C. na Assíria, onde o metano era utilizado para aquecimento das águas de banho”.

O processo de digestão anaeróbia, embora seja um tratamento bastante utilizado, é menos utilizado que os processos aeróbios, visto que estes apresentam alto grau de eficiência. Embora isso ocorra, os processos de digestão anaeróbia têm uma grande vantagem na recuperação de recursos, tendo em vista a produção de metano, além de controlar a poluição de uma forma geral, já que trata resíduos com altas cargas orgânicas. (CHAN *et al.*, 2009). A Tabela 1 relaciona a utilização de processos aeróbios *versus* processos anaeróbios.

Tabela 1 - Comparação entre os tratamentos aeróbios e anaeróbios

Recurso	Tratamento aeróbio	Tratamento anaeróbio
Eficiência na remoção de orgânicos	Alta	Alta
Qualidade de efluente	Excelente	Moderado a pobre
Taxa de carga orgânica	Moderada	Alta
Produção de lodo	Alta	Baixa
Exigência nutricional	Alta	Baixa
Requisito de alcalinidade	Baixa	Alto
Exigência de energia	Alta	Baixa à moderada
Sensibilidade a temperatura	Baixa	Alta
Tempo de partida	2 – 4 semanas	2 – 4 meses
Odor	Menos odor	Possíveis problemas de odor
Recuperação de bioenergia e nutriente	Não	Sim
Modo de tratamento	Total	Essencialmente pré-tratamento

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

A digestão anaeróbia é um processo em que diversos grupos microbianos convertem matéria orgânica em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico, amônia, dentre outros. Esse processo ocorre pelas seguintes rotas metabólicas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Nessas rotas, alguns grupos de micro-organismos estão envolvidos, dentre os quais: bactérias fermentativas (hidrolíticas e acidogênicas), bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas. (CHERNICHARO, 1997). Os micro-organismos anaeróbios, de uma maneira geral, são encontrados naturalmente em alguns habitats específicos que apresentam baixos potenciais de oxido-redução, como no interior de solos, na rizosfera de plantas, nos sedimentos de mares, rios e lagos, em alagados, pântanos, mangues, geotermas, mantas microbianas, assim como no trato intestinal de animais ruminantes. (MELO, AZEVEDO, 2008).

A seguir, são listadas e descritas as etapas do processo anaeróbio, bem como os micro-organismos que participam de cada etapa:

1. Hidrólise – bactérias fermentativas hidrolíticas excretam enzimas que convertem os compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em

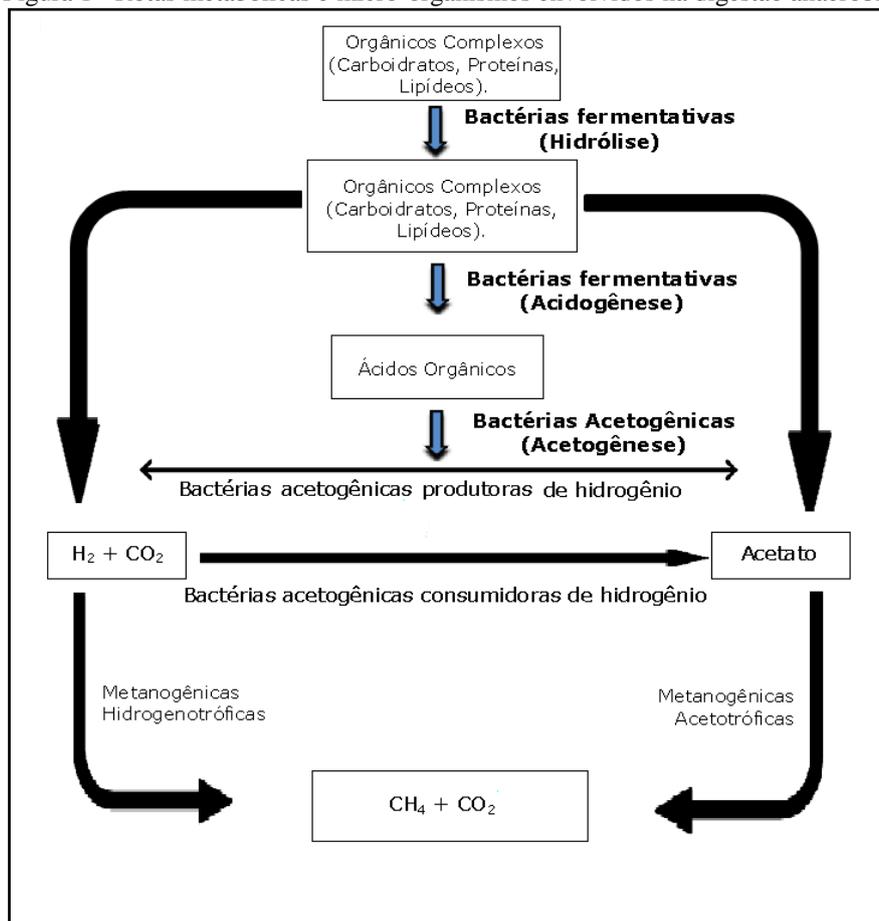
compostos orgânicos simples (açúcares, aminoácidos e peptídeos). A matéria orgânica menos complexa torna-se mais facilmente assimilável pelo grupo de bactérias acidogênicas. O êxito do processo de hidrólise é dependente de vários fatores, tais como a temperatura no reator, tempo de residência do substrato no reator, composição do substrato, pH do meio, concentração de íons amônio, concentração de produtos da hidrólise, bem como o contato eficiente entre biomassa e o substrato. (ANGELIDAKI, SANDERS, 2004; CHERNICHARO, 1997)

2. Acidogênese – os compostos orgânicos solúveis provenientes da hidrólise atravessam a parede das bactérias fermentativas acidogênicas, sendo metabolizados no interior dessas bactérias. As bactérias acidogênicas dispõem de várias vias de conversão, por meio das quais resultam produtos fermentativos diversos como AGV (propionato, butirato e valerato), succinato, lactato e alcoóis. (SCHINK, 1997; SILVEIRA, 2009).
3. Acetogênese – as bactérias acetogênicas oxidam compostos intermediários provenientes da acidogênese a substratos assimiláveis pelas arqueias metanogênicas, especialmente acetato e hidrogênio. Dentre esses compostos intermediários, o acetato e o propionato são os compostos que geralmente se encontram em maior quantidade nos biodigestores anaeróbios. (VAVILIN *et al.*, 1995)
4. Metanogênese – os micro-organismos do domínio *Archaea*, que também podem ser denominados arqueias metanogênicas, são os responsáveis pela conversão anaeróbia de compostos orgânicos em metano e gás carbônico. A conversão é realizada por dois grupos de arqueias; as que utilizam acetato para convertê-lo a metano (metanogênicas acetoclásticas) e as que utilizam hidrogênio e gás carbônico para convertê-los a metano (metanogênicas hidrogenotróficas). Essa etapa costuma ser limitante para efluentes solúveis, devido os micro-organismos metanogênicos exigirem condições ambientais extremamente favoráveis. Elevadas concentrações de compostos tais como amônia, sais e AGV podem

inibir as arqueias metanogênicas, principalmente as acetoclásticas (DEMIREL, SCHERER, 2008).

A Figura 1 esquematiza, de maneira resumida, todas as etapas envolvidas na digestão anaeróbia.

Figura 1 - Rotas metabólicas e micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia



Fonte: adaptado de Chernicharo (1997).

As etapas da digestão anaeróbia envolvem tanto micro-organismos como enzimas que são sintetizadas por esses micro-organismos. Durante esse processo, ocorrem diversas reações bioquímicas, sendo essas reações espontâneas em determinadas condições de pH, temperatura e pressão. O parâmetro para medir a espontaneidade das reações é a energia livre de Gibbs padrão (ΔG°). Nesse caso, a espontaneidade da reação se baseia no quanto a energia livre é baixa, ou seja, quanto menor a energia livre, mais espontânea é a reação, sendo determinado que as reações

cuja energia livre é menor que zero são espontâneas, ao passo que as reações com energia livre maior que zero são não-espontâneas (SILVA, 2009).

Na digestão anaeróbia ocorrem reações espontâneas e não-espontâneas, sendo que para as reações não-espontâneas é importante que se mantenham os produtos formados em baixas concentrações.

Os produtos intermediários (AGV) formados a partir da degradação de carboidratos, proteínas e lipídeos são a fonte a partir da qual quase todo metano é produzido. Ocorre que, de acordo com as condições do sistema, os AGV podem ser consumidos rapidamente ou acumularem-se no mesmo (CHERNICHARO, 1997). Com base nisso, a acidogênese, que é a etapa onde ocorre a produção dos AGV, poderá ser a etapa limitante, tendo em vista que o substrato utilizado no processo de digestão anaeróbia pode ser dificilmente hidrolisável (SILVA, 2009).

No processo, são formados diversos produtos intermediários, tais como o ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido láctico, álcool, hidrogênio e CO₂ (CHERNICHARO, 1997; BENGTSSON *et al.*, 2008). Especificamente na acetogênese, onde ocorrem reações de conversão de compostos tais como butirato e propionato a acetato, hidrogênio e CO₂, essas reações em geral apresentam ΔG° positivo, tornando-se importante para garantia de que as reações ocorram, a remoção de hidrogênio, mantendo-se os níveis de pressão do mesmo entre 6 - 400 Pa. Essa remoção é feita, em geral, com o uso de aceptores de elétrons, o que mantém a pressão parcial do hidrogênio baixa, tornando as reações bioquímicas de conversão de alguns compostos (butirato, propionato etc.) a acetato, espontâneas (CHERNICHARO, 1997; SILVA, 2009). A Tabela 2 mostra algumas dessas reações e o ΔG° associado.

Tabela 2- Reações de oxidação de compostos intermediários da DA.

REAÇÕES DE OXIDAÇÃO		ΔG° (kJ)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	$\rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	+ 76,1
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	$\rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+ 48,1
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	$\rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+ 9,6
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	$\rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	- 4,2

Fonte: Adaptado de Chernicharo (1997)

De acordo com a Tabela 2, observa-se que as reações acetogênicas não são espontâneas, sendo que as mesmas não apresentam vantagens em termos termodinâmicos, porém essas reações ocorrem de forma natural em digestores anaeróbios, devido à interação que ocorre entre os micro-organismos acetogênicos e metanogênicos. Essa interação é decorrente da produção de hidrogênio, sendo compensada com o consumo do mesmo nas reações de conversão a metano a partir de micro-organismos metanogênicos hidrogenotróficos (SILVA, 2009).

Os micro-organismos que realizam a conversão da matéria orgânica a biogás diferem-se em vários aspectos, dentre os quais os aspectos fisiológicos, quanto às necessidades nutricionais, à cinética de crescimento e à sensibilidade diante de certas condições ambientais (POHLAND, GHOSH, 1971 apud CHEN *et al.*, 2008). As diferenças existentes entre esses micro-organismos dificultam a manutenção do equilíbrio entre os diversos grupos, o que na maioria das vezes ocasiona instabilidade no reator (DEMIREL, YENIGU, 2002)

São fatores que podem afetar o desempenho dos micro-organismos envolvidos nas transformações biológicas da digestão anaeróbia, dentre outros:

a) Temperatura

A temperatura nos processos de digestão anaeróbia é um fator que influencia acentuadamente. Segundo a literatura, existem três faixas de temperatura nas

quais a digestão anaeróbia ocorre: mesófila (20-45°C), termófila (>45°C) e psicrófila (>20°C) (COATES, 1991 apud PEREIRA, 1998).

No entanto, as faixas ótimas de temperatura para digestão anaeróbia são as faixas mesófila e termófila. Segundo Chernicharo (1997), a maior parte dos biodigestores anaeróbios é projetada para operar na faixa mesófila, embora na faixa termófila existam experimentos com ótimos resultados, porém diversas questões como suplemento de energia no aquecimento dos reatores, instabilidade do processo podem representar desvantagens significativas, o que provoca um sobrenadante com propriedades ruins (elevada DQO, sólidos, etc). Segundo Chen *et al.* (2008), as mudanças de temperatura afetam as taxas de crescimento microbiano e a concentração de NH₃, porém um aumento na temperatura em geral tem um efeito positivo sobre a taxa metabólica dos micro-organismos.

b) pH, Alcalinidade e AGV

Esses fatores são interligados por uma relação importante, de modo a manter um bom funcionamento dos processos de conversão anaeróbia, garantindo situação propícia aos micro-organismos responsáveis por esses processos.

Para digestão anaeróbia, especialmente para os micro-organismos metanogênicos, o pH apresenta faixa ótima entre 6,6 e 7,4. Valores acima de 8,3 e inferiores a 6,0 podem ser totalmente prejudiciais aos micro-organismos metanogênicos, devendo ser evitados (CHERNICHARO, 1997). Além dos aspectos físico-químicos, o pH afeta o crescimento dos micro-organismos, visto que influencia o seu metabolismo, direcionando a utilização de fontes de carbono e energia, influenciando nas reações de síntese e produção de metabólitos (RIBEIRO, 1999).

A alcalinidade na digestão anaeróbia auxilia o equilíbrio do sistema, conferindo capacidade tampão ao meio, apesar da produção dos ácidos graxos voláteis decorrentes da hidrólise e acidogênese. Caso não haja concentração de alcalinizante suficiente, o pH pode diminuir a níveis tais de modo a inibir o processo de digestão anaeróbia. O processo dependente da alcalinidade e AGV é dinâmico, de modo que é

preciso uma interação entre as quantidades de AGV produzidos, bem como de alcalinidade suficiente para neutralizar esses AGV.

c) Nutrientes.

Os nutrientes são compostos e elementos necessários para o crescimento e atividade microbiana. É importante que todos os componentes estejam presentes em quantidades mínimas requeridas pelos micro-organismos (ECKE, LAGERKVIST, 2000). Os nutrientes são de extrema importância para os micro-organismos anaeróbios, sendo o nitrogênio (N) e fósforo (P) macronutrientes essenciais ao funcionamento de todo sistema biológico, além de macronutrientes tais como carbono, oxigênio, enxofre, potássio, cálcio e magnésio. Existem ainda os micronutrientes que também são importantes para os processos anaeróbios (ABES, 1999). Esses compostos são elementos requisitados pelos micro-organismos em baixas concentrações de modo a estimular o processo de digestão anaeróbia, além de alguns deles ter a função de cofatores que se combinam com uma proteína inativa, originando um complexo cataliticamente ativo, os quais são conhecidos como enzimas, que participam das reações biológicas (ECKE, LAGERKVIST, 2000). Dentre os micronutrientes estão: manganês, molibdênio, zinco, cobre, cobalto, níquel, vanádio, boro, dentre outros.

d) Substâncias tóxicas ou inibitórias

As substâncias tóxicas ou inibitórias são um parâmetro de grande importância no funcionamento de reatores anaeróbios. Esses compostos são causa de instabilidade nesses reatores, o que gera uma ideia de que esse processo de tratamento é inviável, no que diz respeito às características de estabilidade. Porém, o uso disseminado da tecnologia se apresenta bastante favorável no que diz respeito à sustentabilidade e viabilidade, tanto econômica como ecológica. (AQUINO, CHERNICHARO, 2005).

Quanto aos compostos que podem provocar a inibição do processo de digestão anaeróbia, o próprio substrato pode conter algumas dessas substâncias que são potencialmente inibitórias, além de subprodutos resultantes do metabolismo das bactérias (SILVEIRA, 2009).

Dentre os compostos tóxicos, podem ser citados a amônia, o sulfeto e os metais pesados. A amônia está diretamente interligada a toxicidade dos reatores anaeróbios, especialmente por estar associada à hidrólise; esse composto é liberado a partir de substratos com alto teor de proteínas e uréia (BORJA *et al.*, 1996). A amônia livre (NH_3) é a forma mais tóxica de nitrogênio, pois é capaz de penetrar na membrana plasmática das células dos micro-organismos procariotos, o que causa desestabilização no balanço de prótons ou ainda causa deficiência de potássio (CHEN *et al.*, 2008).

O sulfeto, além de ser muito reativo e corrosivo, é também bastante tóxico para os micro-organismos e seres vivos, incluindo o homem. Quando o substrato utilizado na digestão anaeróbia apresenta elevados teores de sulfato, ocorre a produção de sulfeto pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS). Nesse caso, tanto pode ocorrer inibição por sulfeto como competição pelos substratos por parte das BRS e micro-organismos responsáveis pela digestão anaeróbia (HARADA *et al.*, 1994).

Os metais pesados apresentam efeito inibitório à digestão anaeróbia, apesar de muitos fazerem parte das enzimas essenciais das reações bioquímicas anaeróbias. Esses elementos podem ser encontrados em águas residuárias e no lodo, em concentrações significativas. Dentre os metais pesados, incluem-se o cromo, ferro, cobalto, cobre, zinco, cádmio e níquel (CHEN *et al.*, 2008). Esses compostos, ao contrário de muitas substâncias tóxicas, não são biodegradáveis, o que permite sua acumulação até concentrações potencialmente tóxicas. Os fatores que ocasionam a toxicidade são, na maioria das vezes, relacionados a fatores tais como pH e potencial redox (ZAYED, WINTER, 2000).

3.2 Microalgas

3.2.1 Conceitos e Aplicações

Microalgas são micro-organismos geralmente microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos que possuem clorofila e são fototróficos, sendo capazes de utilizar CO₂ para produzir oxigênio na presença de luz. Estes organismos têm como habitat natural a água e são organismos bastante diversificados quanto a sua morfologia e estrutura celular (OLAIZOLA, 2003; PEQUENO, 2010). A literatura traz informações a respeito de que existem dezenas de milhares de espécies de microalgas, algumas centenas são estudadas quanto ao seu conteúdo químico e apenas umas poucas espécies têm sido cultivadas em quantidades industriais (OLAIZOLA, 2003).

As microalgas são usadas há séculos por povos nativos, os quais as utilizavam como fonte de alimentação, especialmente as espécies do gênero *Nostoc* na Ásia. Mesmo nos dias atuais, os nativos de Chade dependem da coleta da microalga *Spirulina* spp., para sobreviverem em determinadas épocas do ano (JOURDAN, 1996; OLAIZOLA, 2003; BERTOLDI, 2008). Esses organismos apresentam capacidade intensa de crescimento, se mantidos em condições favoráveis, além disso, as microalgas apresentam elevado potencial econômico, por possuírem substâncias com elevada importância industrial, sendo uma fonte pouco explorada.

Dentre as aplicações da biomassa microalgal estão: produção de proteína unicelular, lipídios, corantes, enzimas, antibióticos, carboidratos e vitaminas, dentre outros. Produzem até mesmo compostos considerados bioativos naturais, para aplicação em alimentos funcionais (DERNER *et al.*, 2006; BERTOLDI, 2008; PEQUENO, 2010). Aplicações tais como geração de biomassa para alimentação animal e humana também são relatadas (LOURENÇO, 2006). A Figura 2 mostra uma separação em grande escala de microalgas cultivadas, após a filtração.

Figura 2- Biomassa microalgal recuperada do caldo de cultura por filtração.



Fonte: Chisti (2007)

Derner *et al.* (2006) citam muitas aplicações de microalgas, tais como o emprego em tratamento de águas residuárias, desintoxicação biológica, remoção de metais pesados, bioindicadores na detecção de nutrientes e substâncias tóxicas, biofertilizantes do solo na agricultura e outras diversas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica.

Dentre os potenciais usos de microalgas, destaca-se o cultivo de microalgas para produção de oxigênio e produção de biodiesel, o que conseqüentemente gera biomassa em excesso. No entanto, a biomassa gerada nesse processo pode ser aplicada, com auxílio da digestão anaeróbia, na produção de energia (metano). O crescimento de microalgas ainda pode auxiliar na remoção de CO₂ atmosférico, o qual provoca problemas sérios relacionados ao aquecimento global.

A importância ambiental de microalgas em ecossistemas aquáticos está interligada também à manutenção do corpo hídrico, bem como são aplicadas em testes de toxicidade. Em geral, a importância das microalgas, bem como algas em geral, reside nos parâmetros ambiental, biológico e econômico (LOURENÇO, 2006).

A grande dificuldade encontrada nos trabalhos que envolvem a utilização de microalgas está no fato de esses micro-organismos não estarem diretamente disponíveis para extração, como no caso do extrativismo vegetal e animal, sendo necessária a coleta e cultivo desses micro-organismos em condições extremamente favoráveis para que se

tornem utilizáveis pelo homem, porém as microalgas apresentam grande potencial biotecnológico, o que tem permitido a aplicação de técnicas de melhoramento genético e o estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala (DERNER *et al.*, 2006; LOURENÇO, 2006).

O potencial de micro-organismos fotossintéticos como uma alternativa a produção de biocombustíveis, juntamente com o seu potencial como uma promissora tecnologia para a fixação de CO₂ é um assunto de grande interesse e destaque em pesquisas acadêmicas e industriais (SIALVE *et al.*, 2009). As microalgas têm se tornado uma importante fonte de produção de biodiesel frente às oleaginosas, resíduos de óleo de cozinha e gordura animal, principalmente por esses resíduos não suprirem, em termos quantitativos, a demanda existente. Segundo Chisti (2007), as microalgas apresentam características que as tornam a única fonte de biodiesel renovável capaz de suprir a demanda global. O autor cita ainda que a produtividade de triglicérides de microalgas em muito excede a produtividade de triglicérides de culturas oleaginosas, tornando-as até mesmo mais eficiente que plantas cultivadas. Esses micro-organismos tornam-se uma fonte atrativa para produção de biodiesel devido a seu alto teor lipídico, bem como a forma de obtenção não exigir utilização de terra arável para cultivo de outras culturas (NEENAN *et al.*, 1986).

Segundo Chisti (2007), caso todo o combustível consumido em veículos nos Estados Unidos fosse substituído por biodiesel, haveria uma demanda de 0,53 bilhões de m³ de biodiesel anualmente, de acordo com o consumo atual. Dessa forma, partindo do biodiesel produzido por oleaginosas, óleo de cozinha residual e gordura animal, essa demanda não seria satisfeita, visto que a exigência de grandes áreas de cultivo seria insustentável para tais culturas.

Ehimen *et al.* (2009) destacam que as microalgas ainda não estão estabelecidas dentre as culturas energéticas convencionais para produção de biodiesel, sendo de extrema importância a realização de avaliações representativas do rendimento energético disponível a partir desta matéria prima, visto que essas avaliações fornecem informações prévias bastante úteis referentes à produção de biodiesel no processo de transesterificação.

A Tabela 3 mostra uma comparação entre rendimentos de óleo em culturas oleaginosas em comparação com as microalgas, bem como o requerimento de área para cada fonte apresentada.

Tabela 3 - Comparação dos rendimentos de óleo de algumas fontes.

Fontes	Rendimento de óleo (L/ha)	Requisitos de área (Mha)
Milho	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
Coco	2689	99
Óleo de palma	5950	45
Microalgas(70%p/óleo)	136,9	2
Microalgas (30%p/óleo)	58,7	4,5

Fonte: Adaptada de Chisti (2007)

Além do biodiesel, as microalgas também podem fornecer metano e hidrogênio a partir da digestão anaeróbia da biomassa microalgal (SPOLAORE *et al.*, 2006; TABATABAEI *et al.*, 2011). Diante de preocupações tais como a esgotabilidade dos combustíveis fósseis, a utilização de terras áridas e culturas alimentares para geração de bioenergia alternativa (Biodiesel), tem se intensificado a investigação sobre a produção de biomassa das microalgas para geração de biocombustíveis (EHIMEN *et al.*, 2009).

Estudos têm sido realizados de modo a fornecer subsídios teóricos quanto à utilização de biomassa microalgal para a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia. Na digestão anaeróbia, os rendimentos de metano obtidos experimentalmente permitem utilizar modelagem de processos e análise de custos, visando esclarecer a viabilidade do processo, integrando-se sistemas de produção de biodiesel versus biogás utilizando microalgas como matéria-prima comum (EHIMEN *et al.*, 2009).

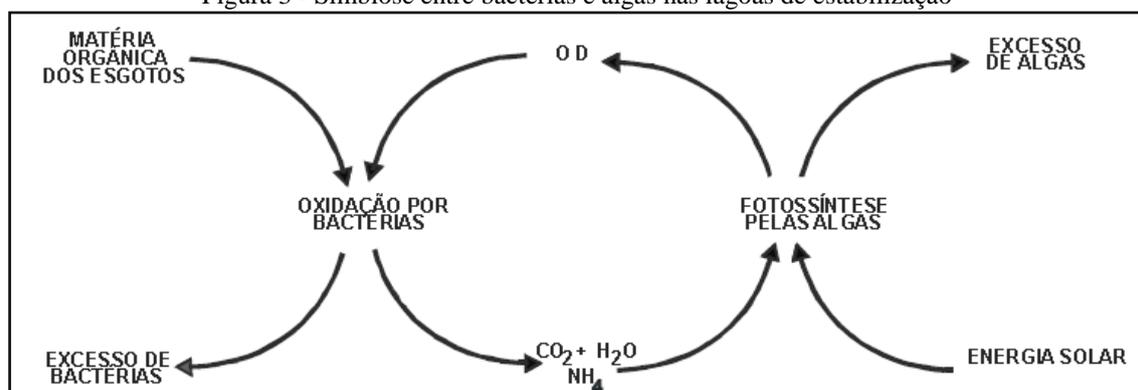
A biomassa resultante das microalgas que passam pelo processo de transesterificação para produção de biodiesel pode também ser reaproveitada no

processo de digestão anaeróbia para produção de metano, sendo que essa reutilização de microalgas, já proveniente da produção de biodiesel, que também é uma energia renovável, permite que seja alcançado um equilíbrio econômico. Dessa forma, a digestão não apenas recicla o nitrogênio e fósforo, mas também produz energia a partir do metano com valor agregado e equilíbrio energético do processo de microalgas para biocombustíveis (CHISTI, 2007; SIALVE *et al.*, 2009).

3.2.2 Microalgas e as lagoas de estabilização

As lagoas de estabilização são sistemas de tratamento de esgoto simples e de funcionamento natural, onde ocorre um processo simbiótico entre bactérias e algas, para estabilizar a matéria orgânica e reduzir os micro-organismos, especialmente os patogênicos, evitando disseminação de doenças e degradação ambiental (VON SPERLING, 1986; CAVALCANTI *et al.*, 2010). Essa simbiose, comumente observada em sistema de lagoas de estabilização, pode ser ilustrada conforme a Figura 3.

Figura 3 - Simbiose entre bactérias e algas nas lagoas de estabilização



Fonte: CETESB, 2009.

Existem diversos motivos que justificam a reutilização das microalgas provenientes de lagoas de estabilização. Segundo Mota (1995), as microalgas, quando em proliferação excessiva, causam danos como sabor, odor, toxidez, turbidez, cor, matéria orgânica e redução de OD. Além desses problemas, as cianobactérias, espécies

de microalgas, liberam cianotoxinas, substâncias que causam graves problemas a animais terrestres, aquáticos e humanos, por meio de contato com água contaminada, além de acarretar graves problemas para as ETE que utilizam tratamentos convencionais ou ainda filtração direta (CARNEIRO, LEITE, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2010).

3.2.3 Biodegradabilidade das microalgas

A composição das microalgas é um fator importante para determinar sua digestão em potencial. Quanto aos requisitos de nutrientes da microflora anaeróbia, a literatura mostra que estes são atendidos pela composição das microalgas, visto que elas apresentam em sua composição carbono, nitrogênio e fósforo, além de outros micronutrientes importantes como ferro, zinco e cobalto (GROBBELAAR 2004 apud SIALVE *et al.*, 2009).

A parede celular resistente das microalgas e a sua composição bioquímica são geralmente fatores limitantes para a biodegradabilidade celular, porém alternativas de pré-tratamentos, co-digestão ou controle da composição bruta são estratégias que podem aumentar o rendimento de conversão das microalgas a metano de forma significativa e eficiente. Outro problema associado à degradação de microalgas é o alto teor de proteína celular, o que resulta na liberação de amônia e pode levar à toxicidade em potencial para os micro-organismos (CHEN, OSWALD, 1998; SIALVE *et al.*, 2009). Por outro lado, microalgas contêm pouca ou quase nenhuma lignina, o que contribui para uma boa estabilidade e conversão de alta eficiência no processo de digestão anaeróbia, se comparado a outros substratos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

A composição celular desses micro-organismos é muito variável, dependendo da espécie, sendo as composições para proteínas (6 – 52%), carboidratos (5 – 23%) e lipídeos (7 – 23%) (BROWN *et al.*, 1997). Essa composição é um fator bastante influente na digestão anaeróbia das microalgas, podendo afetá-la, pois as espécies com elevada percentagem de proteínas são caracterizadas por uma baixa relação C/N, sendo em média de 10,2 para microalgas de água doce (ELSER *et al.*, 2000).

A produção de metano a partir de microalgas é efetuada por conversão em múltiplos estágios biológicos, que envolve a degradação anaeróbia dos compostos complexos da biomassa, a fim de reduzir compostos de alto peso molecular até produção de CH₄ e CO₂, bem como pequenas quantidades de gases tais como gás sulfídrico (H₂S), hidrogênio (H₂), amônia (NH₃), gases traços e vapor d'água (EHIMEN *et al.*, 2009).

A literatura apresenta diversas espécies de microalgas que apresentam ótimos rendimentos de metano quando submetidas ao processo de digestão anaeróbia, porém muitas microalgas, por apresentarem parede celular de caráter recalcitrante, bloqueiam a atividade enzimática do consórcio anaeróbio, tendo reduzida a sua biodegradabilidade. Experimentos realizados por Golueke *et al.* (1957) mostraram que, mesmo durante a fase experimental, foram encontradas células intactas no digestor e que essa parede celular ainda se apresenta rígida à digestão anaeróbia, mesmo após a lise celular para extração lipídica. Uziel (1978) (apud SIALVE *et al.*, 2009) também relatou a presença de células intactas após 30 dias de iniciada a fase experimental. A Tabela 4 faz um breve resumo de dados obtidos com relação a algumas espécies de microalgas, suas proporções nutricionais e rendimentos de metano.

Tabela 4 - Estimativa de produção de metano de espécies de *Chlorella*, sob diferentes condições de crescimento e teor nutricional das espécies.

Espécies	Proteínas (%)	Lipídeos(%)	Carboidratos(%)	CH ₄ (L. gSV ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	29	18	51	0,64
<i>C. vulgaris</i> *	7	40	55	0,69
<i>C. emersonii</i>	32	29	41	0,74
<i>C. emersonii</i> *	28	63	11	0,92
<i>C. protothecoides</i>	38	11	52	0,65
<i>C. protothecoides</i> *	36	23	41	0,71

Fonte: Adaptado de Sialve *et al.*, (2009).

Nota: *baixa concentração de nitrogênio (N).

Apesar de apresentarem parede celular rígida na maioria das vezes, existem espécies que são desprovidas dessa parede celular. Henrard *et al.* (2011) realizaram o

experimento de degradação anaeróbia da espécie de microalga *Spirulina*, sendo sua utilização justificada por ausência de parede celulósica e alto teor de matéria orgânica (93%), tornando a espécie um substrato promissor para conversão a metano na digestão anaeróbia.

A biodegradabilidade de microalgas tem sido melhorada com técnicas de pré-tratamento do substrato da digestão anaeróbia, incluindo pré-tratamento físico-químico, químico, térmico, ultrassônico, dentre outros. Esses pré-tratamentos provocam a quebra de compostos dificilmente hidrolisáveis, tornando a matéria orgânica mais acessível à microflora anaeróbia, aumentando a cinética de produção e o rendimento de metano (SIALVE *et al.*, 2009).

Chen e Oswald (1998) estudaram diferentes pré-tratamentos para biomassa algal produzida em lagoas de estabilização. Os autores investigaram o efeito da temperatura, duração do tratamento, concentração de substrato e adição de hidróxido de sódio. Dentre os pré-tratamentos, eles concluíram que a temperatura tinha efeito mais importante, sendo o melhor pré-tratamento o realizado a 100°C durante 8 horas, resultando em 33% de melhoria na produção de metano.

Visto que a composição do substrato utilizado no digestor influencia bastante na produção de biogás, a co-digestão é uma estratégia utilizada para melhorar a produção de biogás. Segundo Speece (1996) (apud SIALVE *et al.*, 2009), quando a relação C/N é menor que 20, há um desequilíbrio entre os requisitos de carbono e nitrogênio para a microflora anaeróbia. Em se tratando de microalgas que têm alto teor protéico, conseqüentemente alto valor de nitrogênio, esse desequilíbrio pode ser acentuado até mesmo por altas taxas de produção de amônia, composto inibitório dos micro-organismos anaeróbios, o que pode provocar acúmulo de AGV, colocando em risco a estabilidade do processo. Em vista disso, a co-digestão de microalgas com um substrato pobre em nitrogênio representa uma alternativa para melhorar a relação C/N, evitando problemas relacionados (SIALVE *et al.*, 2009).

Yen e Brune (2007) realizaram um experimento de co-digestão de algas e papel (fonte de carbono) para obter uma relação equilibrada C/N. Os autores relatam que houve um melhoramento significativo no aumento da taxa de produção de metano, com adição de 50% (com base nos SV) de resíduos de papel, alimentação de 4g SV/L.d,

35°C e TDH de 10 dias, sendo o rendimento diário de 1170 ± 75 mL CH₄/L.d, quando comparado à digestão apenas de microalgas, onde o rendimento foi de 573 ± 28 mL CH₄/L.d. A maior taxa de produção de metano observada no trabalho foi de 1607 ± 17 mL CH₄/L.d, para 60% (com base nos SV) de papel em co-digestão com algas, onde a alimentação foi de 54 g SV/L.d. Na ocasião, a relação C/N era na faixa de 20 – 25, sendo essa relação sugerida como a ótima.

Ehimen *et al.* (2009) realizaram co-digestão de microalgas, anteriormente utilizadas para extração de lipídeos, com intuito de produzir biodiesel, em co-digestão com glicerol. Os autores investigaram os rendimentos práticos viáveis da conversão anaeróbia de resíduos de microalgas e glicerol. Eles observaram uma recuperação energética de 8,7–10,5 MJ/kg de resíduo seco de biomassa microalgal obtidos após o uso na extração de lipídeos e transesterificação das amostras de microalgas.

Park e Li (2012) realizaram a co-digestão anaeróbia de resíduos de biomassa algal e resíduos de óleos, graxas e gorduras. A partir do experimento, os autores chegaram à conclusão de que a co-digestão de ambos os tipos de resíduos permite um aumento na carga orgânica aplicada de 3 g SV/L.d. O mesmo aumento de carga orgânica para digestão de 100% de resíduos de biomassa algal ou 100% de resíduos de óleos, graxas e gorduras apresentou, segundo os autores, um efeito inibitório à digestão. Eles citam ainda que a digestão dos resíduos separadamente, além de permitir a aplicação de carga orgânica menor, não leva a um rendimento de metano específico desejável, o que se observa na co-digestão, com rendimentos de metano específico na faixa de 0,54 L CH₄/gSV. d.

A Tabela 5 mostra os rendimentos de metano, obtidos na conversão anaeróbia de amostras diversas de algas ou microalgas, em co-digestão ou não.

Tabela 5 - Rendimento de metano a partir de algumas espécies de algas e microalgas.

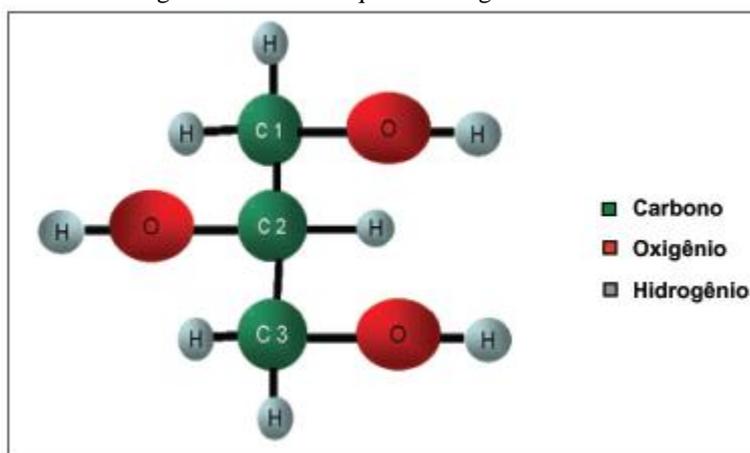
Biomassa	CH ₄ (m ³ kg ⁻¹ SV)	Referência
<i>Laminaria sp.</i>	0,26 – 0,28	Chynoweth (2005)
<i>Macrocystis</i>	0,39 – 0,41	Chynoweth (2005)
<i>L. Digitata</i>	0,50	Briand e Morand (1997)
<i>Ulva sp.</i>	0,20	Morand e Briand (1999)
<i>Chlorella</i>	0,222-0,267	Ehimen <i>et al.</i> (2009)
<i>Resíduos de Algas + papel</i>	0,292	Yen e Brune (2007)

Fonte: Autora

3.3 Glicerol

O glicerol é um poli-álcool que tem como nomenclatura, de acordo com a IUPAC, 1,2,3 – propanotriol, também conhecido como glicerol, apresenta-se no estado líquido à temperatura ambiente, é higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O glicerol é matéria prima em diversas áreas, tais como na pintura, cosméticos, indústria automotiva, alimentos, papel e celulose, couro, têxtil e produção de produtos químicos. (WANG *et al.*, 2001). A Figura 4 mostra a estrutura do glicerol.

Figura 4 - Estrutura química do glicerol



Fonte: Arruda *et al.* (2007).

Segundo Arruda *et al.* (2007), o glicerol foi descoberto em 1779 por Scheele. O glicerol foi extraído de uma mistura aquecida de litargírio e azeite de oliva por Scheele. Este composto pode ser obtido por processos microbiológicos e por síntese de propileno, sendo este último o mais utilizado, devido seu maior rendimento e dificuldade de extração de caldos fermentados.

A produção de glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel, se dá por uma reação química de transesterificação, que consiste em um óleo vegetal (triglicerídeo) reagindo com um álcool (geralmente metanol ou etanol), catalisada por uma base (KOH ou NaOH) (ROBRA, 2006). Após a reação de transesterificação, o glicerol e os ésteres, produtos da reação, formam um líquido de duas fases facilmente separáveis por decantação e centrifugação, sendo o biodiesel (ésteres metílicos ou etílicos) a fase menos densa, ficando na parte superior e o glicerol, fase mais densa, ficando na parte inferior (RIVALDI *et al.*, 2008). A Figura 5 ilustra a separação de fases entre biodiesel (fase superior) e glicerol (fase inferior).

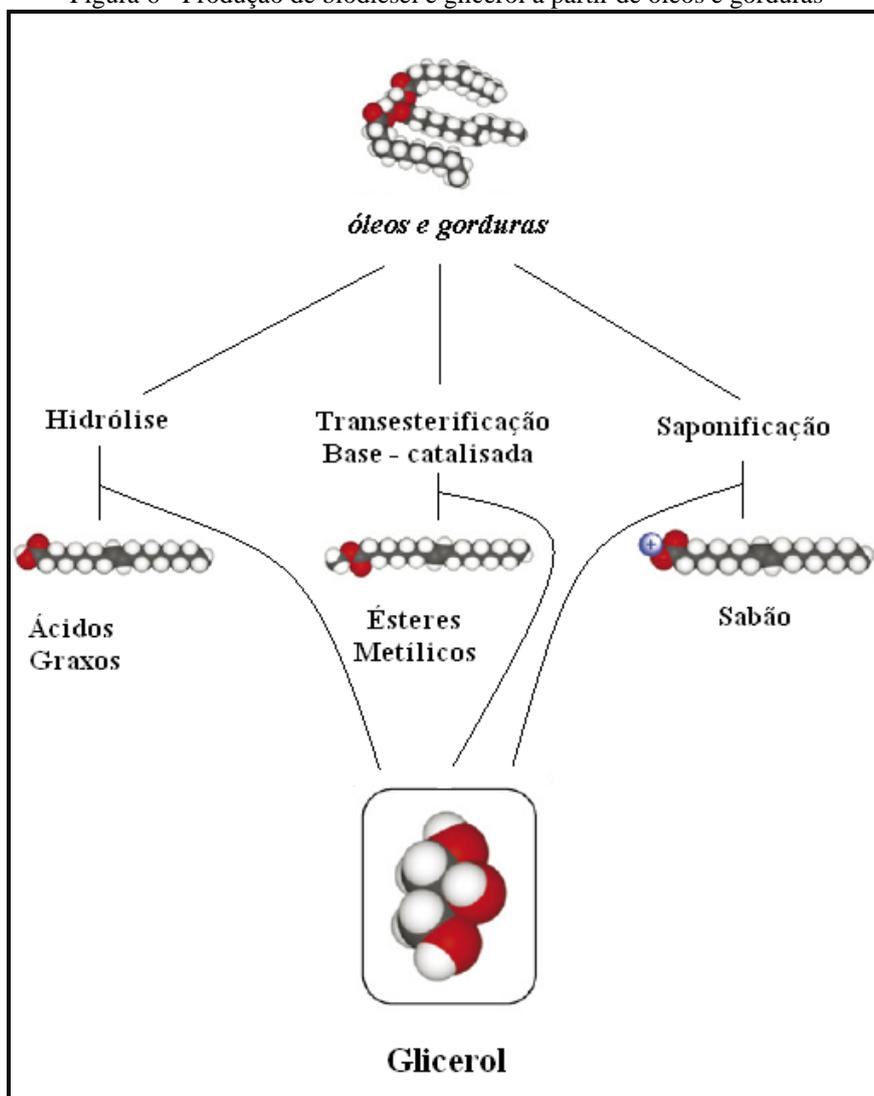
Figura 5 - Separação de fases após reação de transesterificação para produção de biodiesel.



Fonte: Boni (2008)

A reação de transesterificação de triglicerídeos, com consequente produção de biodiesel e glicerol, pode ser representada como ilustrada na Figura 6.

Figura 6 - Produção de biodiesel e glicerol a partir de óleos e gorduras



Fonte: Adaptado de Yazdani e Gonzalez (2007)

Devido ao aumento gradativo da proporção de biodiesel adicionado ao diesel, tem sido cada vez maior a quantidade de glicerol gerado a partir desse processo, o que gera questões sobre a necessidade de alternativas para o reaproveitamento desse glicerol de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável, visto que o mercado não absorve este co-produto, sendo de extrema importância a busca de novas aplicações (ROBRA, 2006). Com a produção de 100 kg de biodiesel, são produzidos 10

kg de glicerol contendo impurezas, o qual ocasiona problemas ambientais devido à necessidade de eliminação desse produto. Uma das aplicações do glicerol que agrega valor ao produto é a degradação anaeróbia desse produto para geração de energia.

A literatura, de uma forma geral, é escassa no que diz respeito à digestão anaeróbia de glicerol residual do biodiesel, porém alguns trabalhos relatam o desempenho desse substrato frente à digestão anaeróbia, bem como as limitações encontradas e sugestões de melhorias paramétricas para degradação biológica e produção de biogás a partir do glicerol residual do biodiesel.

A digestão anaeróbia de glicerol apresenta um potencial teórico de produção de metano de $0,426 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg}$ de glicerol nas CNTP, porém devido a impurezas excessivas no glicerol residual, o valor real obtido é bem inferior ao teórico. Isso ocorre devido à presença de ácidos graxos de cadeia longa e cloretos, o que provoca a inibição do consórcio metanogênico, além da elevada quantidade de MO, que provoca acúmulo de AGV no sistema (LEITÃO *et al.*, 2011; VIANA, 2011).

A literatura apresenta alguns experimentos envolvendo digestão anaeróbia de glicerol, bem como em co-digestão com outros resíduos. Siles *et al.* (2010) estudaram os efeitos da co-digestão anaeróbia de glicerol e águas residuárias provenientes da fabricação de biodiesel. O experimento foi realizado em escala laboratorial, com reatores operando em faixas de temperatura mesofílica (35°C). Após os pré-tratamentos do glicerol e das águas residuárias, foi realizada a digestão empregando inóculo variando de $5,02 - 1,48 \text{ g SSV/g DQO}$. As taxas orgânicas aplicadas foram de $0,27-0,36 \text{ g DQO/g SSV.d}$. O experimento apresentou eficiência prática de 81%, sendo o coeficiente de rendimento de metano igual a $310 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}$ removida.

Siles López *et al.* (2009) testaram a digestão anaeróbia do glicerol proveniente do biodiesel, utilizando reatores operando em faixa de temperatura mesofílica (37°C), com lodo granular e não-granular. O lodo granular era proveniente de um reator anaeróbio utilizado no tratamento de águas residuárias de uma cervejaria, ao passo que o lodo não-granular era proveniente de um reator anaeróbio de uma estação de tratamento de esgoto doméstico. O glicerol utilizado no experimento era residual da produção de biodiesel e continha impurezas tais como água, metanol, sais e

ácidos graxos. Os autores realizaram dois pré-tratamentos distintos no substrato. O primeiro consistia em acidificação com ácido fosfórico seguida de centrifugação para recuperação do catalisador utilizado na reação de transesterificação (KOH). No mesmo pré-tratamento, posteriormente foi realizada destilação a vácuo para remoção de água e metanol, sendo esse substrato denominado glicerol acidificado. O segundo pré-tratamento consistiu na acidificação seguida de destilação (retificação) e posteriormente as impurezas orgânicas do destilado foram removidas por extração líquido-líquido com hexano. O hexano foi eliminado por destilação a vácuo. A esse glicerol, os autores chamaram de glicerol destilado.

A Tabela 6, extraída de Siles López *et al.* (2009) compara as características de glicerol submetido a pré-tratamentos de acidificação e destilação com o glicerol puro comercial.

Tabela 6 - Características do glicerol acidificado, destilado e puro

Parâmetro	Glicerol Acidificado	Glicerol Destilado	Glicerol Puro Comercial
Densidade a 20°C (g/mL)	1,044	1,260	1,261
Índice de refração em 20°C	1,4440	1,4728	1,4746
DQO (g/kg)	1010	1155	1217
Viscosidade dinâmica a 50°C (mPa s)	57	150	152
Cor	Marrom	Incolor	Incolor

Fonte: Siles López, *et al.* (2009)

O rendimento de metano apresentado por Siles López *et al.* (2009) foi de 292 mL CH₄/g DQO removida usando lodo granular e glicerol acidificado, 288 mL CH₄/g DQO removida usando lodo não-granular e glicerol acidificado e 356 mL CH₄/g DQO removida, usando lodo granular e glicerol destilado. As eficiências em cada caso foram de: 76% usando lodo granular e glicerol acidificado, 75% usando lodo não-granular e glicerol acidificado e 93% com lodo granular e glicerol destilado. As melhores eficiências com glicerol destilado foi provavelmente devido à remoção de impurezas orgânicas removidas por extração líquido-líquido com hexano, o que causou menos toxicidade aos micro-organismos da digestão anaeróbia.

Viana (2011) realizou experimentos de degradação de glicerol com DQO média de 1260 g/L, em reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), com volume útil de 14,85 litros em escala laboratorial. Durante seu experimento, o autor utilizou COV de 2,0 até 10,0 kg DQO/m.d, a partir de diversas diluições, variando de 1:1500 a 1:5. Embora o reator tenha removido 97,5% de MO, o autor cita que foi necessário a adição de nutrientes em concentrações adequadas para evitar colapsos no sistema. Nesse experimento, foi obtido um potencial de produção de metano igual a 0,220 m³ CH₄/kg de glicerol alimentado e 59% de CH₄ no biogás.

Hutňan *et al.* (2009) realizaram experimento de degradação anaeróbia de glicerol residual, utilizando reator UASB com 3,7 L de volume útil e faixa de temperatura mesofílica. O experimento foi realizado com um reator utilizando lodo suspenso e outro reator utilizando lodo granular. Para o reator operando com lodo suspenso, o TDH foi de 24 horas e a COV variou entre 1,297 – 4,32 kg/m.d. Durante o funcionamento do reator com lodo suspenso, 494 mL de glicerol bruto foram processados e 358 L de biogás produzidos, sendo uma relação de 0,725 L de biogás/mL de glicerol, porém durante a maior carga aplicada, período com concentração de DQO igual a 2940 mg/L e AGV igual a 860 mg/L, o funcionamento do reator foi interrompido, devido a flotação do lodo. Para o reator operando com lodo granular, a carga orgânica máxima foi de 6,486 kg/m³.d e TDH de 8 horas. A produção de biogás apresentada foi de 0,840 L/mL de glicerol bruto. Em elevadas cargas orgânicas, a concentração de AGV foi de 585 mg/L e ao contrário do reator operando com lodo suspenso, o reator com lodo granular manteve-se estável.

Yang *et al.* (2008) realizaram a digestão anaeróbia de um efluente sintético composto por glicerol e nutrientes, testado sob condições tanto mesofílicas como termofílicas. Os autores obtiveram melhor desempenho em condições termofílicas (em torno de 55°C), obtendo remoções de DQO de 87% para uma COV de 1,00 kg/ m³.d.

Contrim (2009) estudou o tratamento do efluente do processo de produção de biodiesel, utilizando reator ASBR (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*), onde o autor avaliou o efeito do aumento da concentração de DQO, que variou de 500 a 3000 mg DQO/L. Para concentrações de 500, 1000 e 2000 mg DQO/L, sendo as COV aplicadas de 0,60, 1,29 e 2,44 kg DQO/m³.d respectivamente, as remoções de MO

foram de 95, 85 e 73%, respectivamente. O experimento teve uma queda de eficiência de remoção à medida que se aumentavam as COV, não apresentando estabilidade para concentrações afluentes de DQO igual a 3000 mg/L (COV = 3,82 kg DQO/m³.d). O autor utilizou como alimentação águas residuárias, as quais continham glicerol e NaHCO₃, não sendo mencionado a adição de macro e micronutrientes.

Robra (2006) estudou a co-digestão anaeróbia de glicerol e estrume de gado, obtendo melhores resultados de aumento na produção de biogás e teor de metano em relação à digestão dos substratos isoladamente.

3.4 Testes de atividade metanogênica específica e biodegradabilidade

Devido à ausência de outros aspectos que possibilitem a avaliação da composição do consórcio microbiano, bem como se as populações metanogênicas presentes no lodo são suficientes para um desempenho estável dos sistemas anaeróbios é que surgiu a necessidade de um teste que medisse a capacidade do consórcio microbiano em converter o substrato presente no meio a CH₄ (JAWED, TARE, 1999; BARROS *et al.*, 2010).

O teste de atividade metanogênica específica (AME) pode ser definido como a capacidade máxima das arqueias metanogênicas produzirem CH₄ a partir do substrato disponível. Apesar do surgimento dos testes de AME, existe a falta de padronização para tal teste, o que dificulta comparações de resultados obtidos por metodologias distintas (AQUINO *et al.*, 2007).

Buscando uma metodologia adequada para determinação da atividade metanogênica específica, Angelidaki *et al.* (2009) propuseram um protocolo com o objetivo de defini-lo como teste de AME padrão, diminuindo assim os problemas relacionados à comparação de resultados.

O teste de AME baseia-se na inoculação do lodo, com concentração de biomassa conhecida (SV) e o substrato em um recipiente mantido sob condições propícias a anaerobiose (ausência de O₂). Para que seja obtida a máxima atividade

metanogênica específica, são necessárias as condições laboratoriais estritamente controladas (VIANA, 2011). Siles López *et al.* (2009) testaram a atividade metanogênica do lodo utilizado no experimento, obtendo valores de AME variando de 0,87 a 0,99 g DQO-CH₄/g SSV.d.

Souto *et al.* (2010) avaliaram a AME de um lodo proveniente de um reator UASB que trata águas residuárias domésticas. Os autores utilizaram uma relação A/M de 0,2 e obtiveram uma AME de 0,11 g DQO-CH₄/g SSV.d.

Chamy e Ramos (2011) estudaram a AME de lodo adaptado ao tratamento anaeróbio de esterco e lodo não adaptado proveniente de um digestor CSTR (*Continuous stirred tank reactor*). Para o primeiro inóculo, os autores obtiveram AME de 0,14 g DQO-CH₄/g SSV.d e para o segundo, obtiveram AME de 0,17 g DQO-CH₄/g SSV.d.

Ensaio de biodegradabilidade por via anaeróbia são utilizados para estabelecer a biodegradabilidade de determinado resíduo bem como o potencial de metano final produzido (ANGELIDAKI, SANDERS, 2004).

A biodegradabilidade é uma propriedade do substrato utilizado na degradação anaeróbia que se refere à tendência desse substrato ser degradado biologicamente (ROZZI, REMIGI, 2004 apud NIETO, 2006). Um substrato é considerado 100% biodegradável quando toda a MO adicionada ao sistema anaeróbio é convertida a metano e dióxido de carbono. O teste de biodegradabilidade é realizado com intuito de avaliar o quanto determinado substrato é degradável por micro-organismos anaeróbios. Siles López *et al.* (2009) realizaram teste de biodegradabilidade do glicerol, onde verificou-se que o glicerol apresentou 100% de biodegradabilidade, sendo a carga orgânica aplicada de 0,21 a 0,38 kg DQO/m³.d.

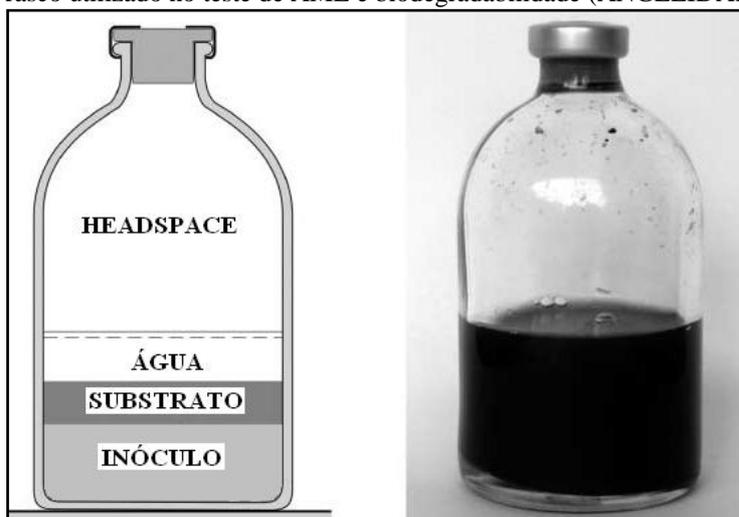
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Testes de atividade metanogênica específica (AME) e biodegradabilidade

Para realização dos testes de AME e biodegradabilidade utilizou-se a mesma metodologia, diferenciando apenas os substratos utilizados, visto que no teste de AME foram utilizados os substratos glicose e AGV, ao passo que no teste de biodegradabilidade, foram utilizados como substratos as microalgas (brutas e pré-tratadas) e o glicerol. Com a existência de muitos protocolos que descrevem metodologias diversas para os testes de atividade metanogênica específica, nesse trabalho optou-se por seguir a metodologia sugerida por Angelidaki *et al.* (2009), que utiliza frascos fechados com *headspace* para avaliação do volume de biogás produzido a partir da medida do aumento de pressão dentro dos frascos, sendo mantidos constantes o volume do *headspace* e a temperatura da fase gasosa.

Os ensaios foram realizados em triplicata para o teste de AME, conforme sugerido por Angelidaki *et al.* (2009), com o intuito de se obter a reprodutibilidade dos testes e dados suficientes para análise estatística. O teste de biodegradabilidade foi realizado em duplicata. Os frascos utilizados nos testes são de vidro com aproximadamente 110 mL de capacidade, previamente calibrados, semelhante aos mostrados na Figura 7.

Figura 7 – Frasco utilizado no teste de AME e biodegradabilidade (ANGELIDAK *et al.*, 2009)

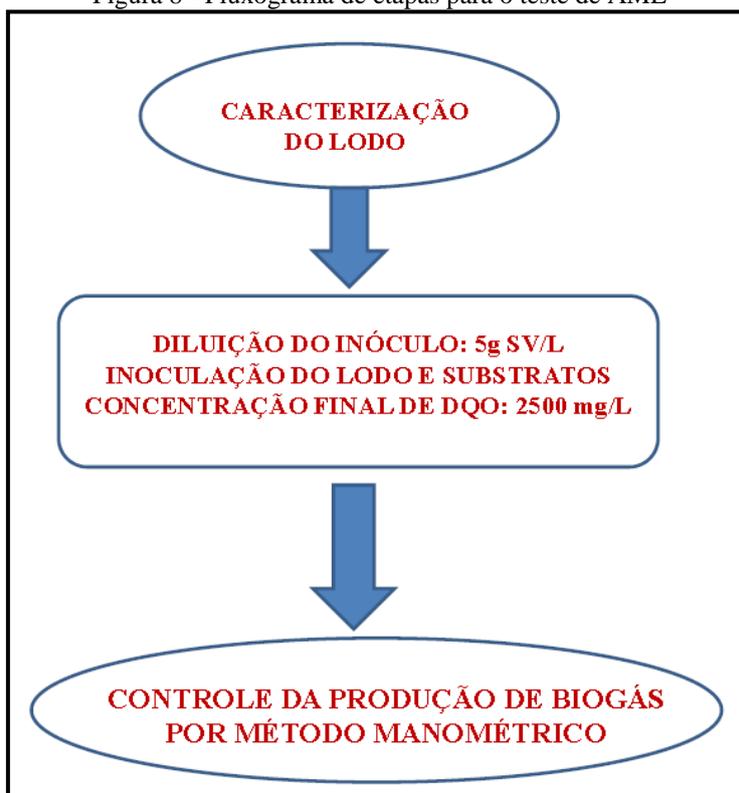


Fonte: Adaptado de Angelidaki *et al.* (2009)

4.1.1 Atividade Metanogênica Específica

Foram realizados testes de AME no lodo de inóculo utilizado no presente experimento com o objetivo de avaliar a atividade das arqueias metanogênicas, possibilitando a estimativa de carga orgânica máxima a ser aplicada ao sistema anaeróbio. No teste de AME, foram utilizados substratos diretamente disponíveis às arqueias metanogênicas, ou seja, glicose e AGV. O fluxograma da Figura 8 expõe, de maneira resumida, as etapas realizadas no teste de AME, bem como também, no teste de biodegradabilidade.

Figura 8 - Fluxograma de etapas para o teste de AME



Fonte: Autora

No presente teste adotou-se a relação substrato/micro-organismos igual a 0,5. Antes de serem incubadas, as amostras de inóculo e substratos tiveram o pH ajustados (6,8 – 7,2) com amostras de HCl e NaOH 0,1N. Foram adicionados macro e micronutrientes em proporções de 10 e 1 mL/L, respectivamente, para suprimento nutricional, possibilitando que as atividades metabólicas ocorressem. A composição de ambas as soluções (macro e micronutrientes) estão detalhadas na Tabela 7 e 8.

Tabela 7 - Concentração da solução de macronutrientes

Nutriente	Concentração (mg/L)
NH₄Cl	280
K₂HPO₄	250
MgSO₄·7H₂O	100
CaCl₂·6H₂O	10

Fonte: Dos Santos (2005)

Tabela 8 - Concentrações da solução de micronutrientes

Nutriente	Concentração (mg/L)
H₃BO₃	50
FeCl₂·4H₂O	2000
ZnCl	50
MnCl₂·4H₂O	500
CuCl₂·2H₂O	38
(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O	50
AlCl₃·6H₂O	90
CoCl₂·6H₂O	2000
NiCl₂·6H₂O	92
NaSeO₃·5H₂O	162
EDTA	1000
HCl 36%	1

Fonte: Dos Santos (2005)

Para garantir um sistema devidamente tamponado, foi adicionado às amostras bicarbonato de sódio (NaHCO₃) na proporção de 1g/g de DQO. Após o lacre dos frascos, foi realizada a purga de oxigênio dentro dos frascos com gás N₂ (nitrogênio gasoso) grau FID, por 1 minuto e em seguida foram incubados. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada substrato (glicose e AGV), bem como para os frascos controle (contendo apenas o inóculo, nutrientes e alcalinizante). Os frascos denominados controle são frascos sem substrato algum, que têm como objetivo estimar o volume de biogás produzido por meio de respiração endógena, para subtrair do valor obtido nos outros frascos, evitando mascaramento no experimento.

Os frascos utilizados nos testes foram incubados em um *shaker orbital* MA-420 Marconi, mantidos sob condições controladas de temperatura (35°C) e agitação (200 rpm), a fim de melhorar o contato entre a biomassa microbiana e o substrato.

O teste foi mantido por tempo suficiente a esgotar-se todo o substrato disponível aos micro-organismos metanogênicos, para conversão a metano. O volume de biogás produzido era medido por método manométrico, visto que a temperatura e volume mantinham-se constantes. O acréscimo da pressão no interior do frasco representava o volume de biogás produzido no *headspace* do frasco. O volume de CH₄ foi obtido a partir da conversão realizada numa planilha de Excel. A Figura 9 mostra o sistema e como eram medidas as pressões.

Figura 9- Sistema com frascos reatores para avaliação do teste de AME e biodegradabilidade.



Fonte: Autora

Os frascos foram mantidos na incubadora até não apresentarem variação na pressão manométrica, indicando que a atividade, no caso da AME, ou a disponibilidade de substrato biodegradável, no caso do teste de biodegradabilidade, havia cessado.

O biogás produzido em ambos os testes foi caracterizado e quantificado a partir de análise cromatográfica, utilizando cromatógrafo gasoso GC 17A, marca Shimadzu, com detector de condutividade térmica (TCD), ilustrado na seção 4.4, Figura 16.

O valor da AME foi dado em função da DQO convertida em metano (g DQO/g SSV.d), conforme a equação abaixo.

$$AME = \frac{\frac{V_{CH_4}}{t}}{FC \cdot SSV \cdot \frac{V_{líq}}{1000}}$$

Onde: V_{CH_4} é o volume de metano produzido durante o tempo do experimento, em mL; t é o tempo de duração do teste, em dias; FC é o fator de conversão estequiométrico (390 mL de CH_4/g DQO_{rem}); SSV é massa estimada de microrganismos presentes na amostra analisada, em g SSV/L; e $V_{líq}$ é o volume de amostra (lodo + meio basal) utilizado no teste de AME, em mL.

O volume de lodo de inóculo para a partida dos reatores foi calculado em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao sistema. Na equação abaixo foi calculado a carga máxima na partida do reator que o lodo de inóculo pode suportar.

$$COV = V_{lodo} \cdot AME \cdot C_{SV} \cdot V_{reator}$$

COV: Carga orgânica volumétrica (g DQO/L.d);

AME: atividade metanogênica específica (g DQO/g SV.d);

C_{SV} : Concentração de sólidos voláteis (g/L) ;

V_{lodo} : Volume de lodo (L);

V_{reator} : volume do reator (L).

4.1.2 Teste de biodegradabilidade

O teste de biodegradabilidade foi realizado para determinar qual seria o melhor pré-tratamento aplicado às microalgas, ou seja, o pré-tratamento que apresentou maior produção de metano, possibilitando a avaliação da viabilidade operacional.

Para o teste de biodegradabilidade, os passos foram semelhantes aos aplicados no teste de AME, porém os substratos utilizados foram glicerol e microalgas. As microalgas foram submetidas a diversos pré-tratamentos conforme a Tabela 9. Os pré-tratamentos térmico e ultrassônico realizados nas microalgas tiveram como objetivo promover a hidrólise das células, tendo em vista que a parede celular das microalgas apresenta rigidez diante da digestão anaeróbia, tornando esse substrato mais disponível ao consórcio anaeróbio e conseqüentemente mais biodegradável (SIALVE *et al.*, 2009).

Tabela 9 - Pré-tratamentos aplicados às microalgas para o teste de biodegradabilidade

Tipo de Pré-tratamento	Tempo (minutos)	
Ultrassom	30	90
Térmico	30	90

Fonte: Autora

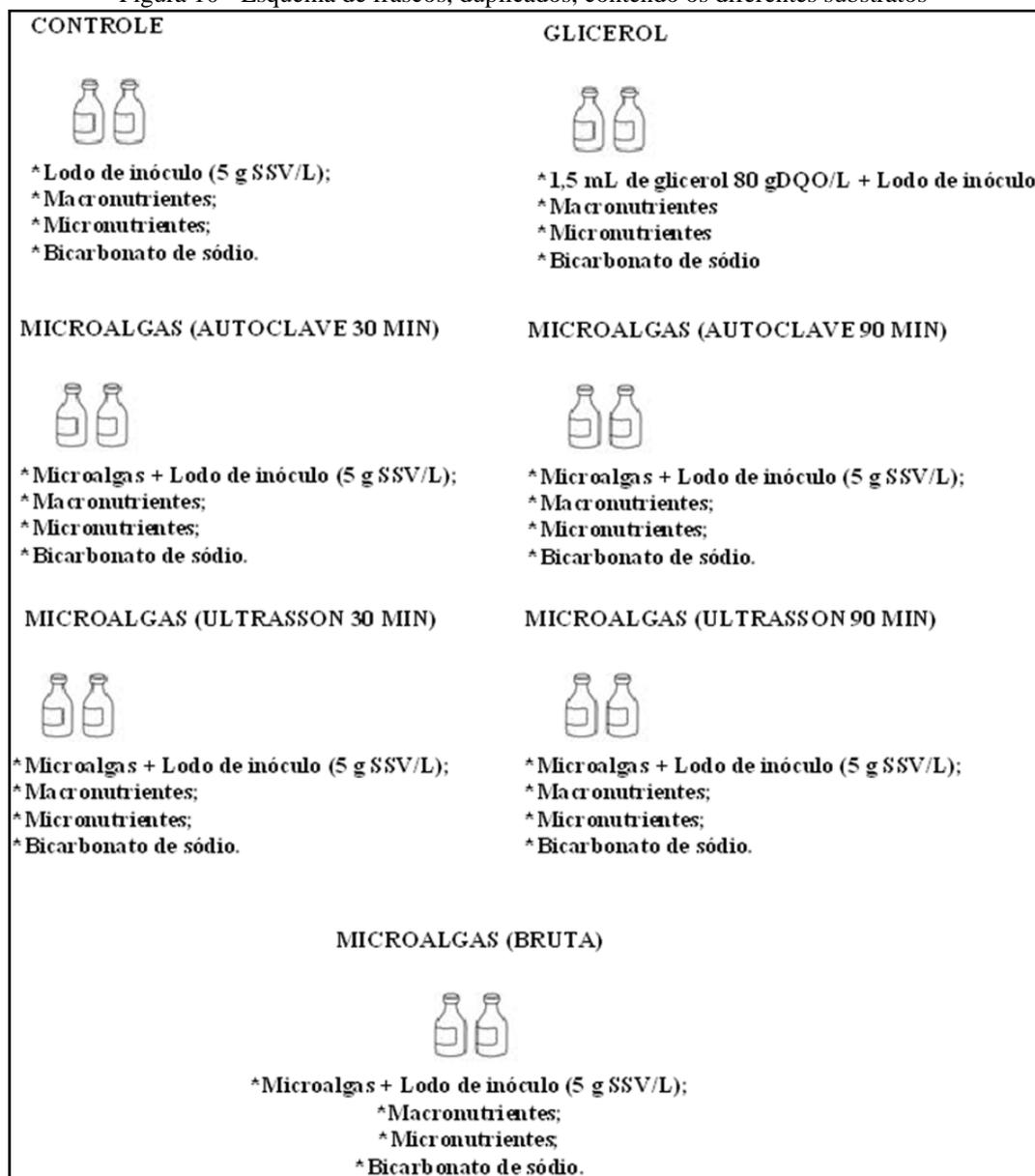
O tratamento ultrassônico consistiu em manter amostras diversas de microalgas sob ondas ultrassônicas por 30 e 90 minutos, respectivamente, utilizando banho ultrassônico (Marca Ultracleaner 1600 A com frequência de 40 kHz) antes de incubá-las para avaliar a biodegradabilidade de cada uma. O tratamento térmico também foi realizado por 30 e 90 minutos, a 120°C e 1 kgf/cm², utilizando para tanto um autoclave vertical (Marca Marconi e pressão máxima de 1,5 kgf/cm²).

As amostras de microalgas pré-tratadas, conforme a Tabela 9, bem como as microalgas (solução bruta) foram usadas para diluir o lodo para uma concentração final de 5 g SSV/L. O pH das soluções foi ajustado (6,8 – 7,2) e em seguida foram adicionados macronutrientes, micronutrientes e bicarbonato de sódio (NaHCO₃), para manter as condições ótimas da digestão anaeróbia. A cada frasco, contendo a solução de microalgas (50 mL) utilizadas para avaliação da biodegradabilidade, foi adicionado 1,5 mL de glicerol (80 g DQO/L), obtendo-se uma concentração de DQO final igual a 2500 mg/L.

Os diferentes parâmetros fixados foram realizados em duplicata, sendo montados também frascos controle apenas com lodo de inóculo e frascos contendo apenas glicerol, visando avaliar a contribuição de ambos individualmente, de acordo

com a Figura 10, permitindo a realização de um planejamento fatorial, visando selecionar as melhores condições estudadas.

Figura 10 - Esquema de frascos, duplicados, contendo os diferentes substratos



Fonte: Autora

De acordo com Neves *et al.* (2002), o planejamento fatorial normalmente é representado por b^k , sendo que k representa o número de fatores e b o número de níveis escolhidos. Além disso, o caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada fator k está presente em apenas dois níveis (experimento fatorial $2k$), ou seja, em um experimento com k fatores (ou variáveis) e dois níveis.

Os parâmetros avaliados foram tipo de pré-tratamento e tempo de exposição. Portanto, trata-se de um planejamento fatorial 2^2 , no qual apenas 4 ensaios são necessários para avaliar todas as combinações possíveis. Entretanto, como o tipo de pré-tratamento é a variável qualitativa nominal, todos os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando 8 ensaios estudados. No entanto, foram realizados ensaios de controle para verificar a produção de metano devido à respiração endógena. Também foram avaliados ensaios com glicerol para verificar a interferência da biomassa algal pré-tratada na produção de metano e, por último, foram montados ensaios com a biomassa algal sem pré-tratamento, para verificar a interferência do pré-tratamento na produção de metano.

Para realizar as análises estatísticas do planejamento experimental fatorial multivariado, utilizou-se o software Statgraphics Centurion XV, que possibilitou a obtenção do tempo de exposição ótimo e o melhor tipo de pré-tratamento, bem como a influência de cada um desses fatores na produção de metano.

4.2 Inóculo

O inóculo utilizado no experimento foi um lodo anaeróbio proveniente de um reator anaeróbio IC (Internal Circulation) de uma estação de tratamento de esgoto de uma indústria de cerveja localizada no município de Horizonte – Ceará, com características próprias de lodo granular. A caracterização do lodo está descrita na Tabela 10.

Tabela 10 - Caracterização do lodo de inóculo

Parâmetros	Unidade	Valores
pH	-	6,82
ST	mg/L	71385
SV	mg/L	52030
SF	mg/L	19355
DQO Total	mg O ₂ /L	26351
DQO Solúvel	mg O ₂ /L	10907
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	1530
Amônia	mg N/L	12,16
NTK	mg N/L	2430

Fonte: Autora

4.3 Substratos

Os substratos utilizados no experimento foram microalgas e glicerol residual do biodiesel. As microalgas utilizadas no experimento foram coletadas das lagoas de estabilização localizadas no Centro de Pesquisa sobre Tratamento de Esgoto e Reúso de Águas, situado em um anexo da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE), no município de Aquiraz-CE.

A ETE mencionada possui um sistema de Lagoas de Estabilização em série com uma lagoa anaeróbia, uma facultativa e duas de maturação, sendo o efluente da última lagoa o utilizado nesta pesquisa. As lagoas são dimensionadas conforme a Tabela 11.

Tabela 11 - Dimensões das lagoas utilizadas no experimento.

Lagoa	Profundidade (m)	Largura do fundo (m)
Anaeróbia	3,00	86,70 x 40,70
Facultativa	1,5	192,70 x 95,50
Maturação A	1,5	154,00 x 72,00
Maturação B	1,5	153,70 x 71,70

Fonte: Autora

Na Figura 11 é possível a observação da distribuição das lagoas de estabilização supracitadas. A Figura 12 mostra o encanamento vindo do final do tratamento das lagoas de estabilização, onde eram realizadas as coletas de efluente com microalgas.

Figura 11 - Imagem de satélite da Estação de Tratamento de Esgoto da CAGECE, destacando as Lagoas de Estabilização e a área experimental, Aquiraz, Ceará.



Fonte: Google

Figura 12 - Ponto de coleta do efluente contendo microalgas



Fonte: Autora

O glicerol residual usado na pesquisa foi proveniente da Usina de Biodiesel da empresa Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobrás, situada em Quixadá-CE.

Nas Tabelas 12 e 13, encontra-se a caracterização dos substratos citados.

Tabela 12 - Caracterização das microalgas

Parâmetros	Microalgas
Amônia (mg/L)	14,56
NTK (mg/L)	20,48
Fósforo Total (mg/L)	3,87
Clorofila ($\mu\text{g/L}$)	400
DQO total (mg/L)	264,22
DQO solúvel (mg/L)	10,32
SST (mg/L)	90
SSV (mg/L)	50

Fonte: Autora

Tabela 13 - Caracterização do glicerol

Parâmetros	Glicerol
DQO total (mg/L)	805082
Amônia (mg/L)	0,896
Alcalinidade (mg/L)	301,1

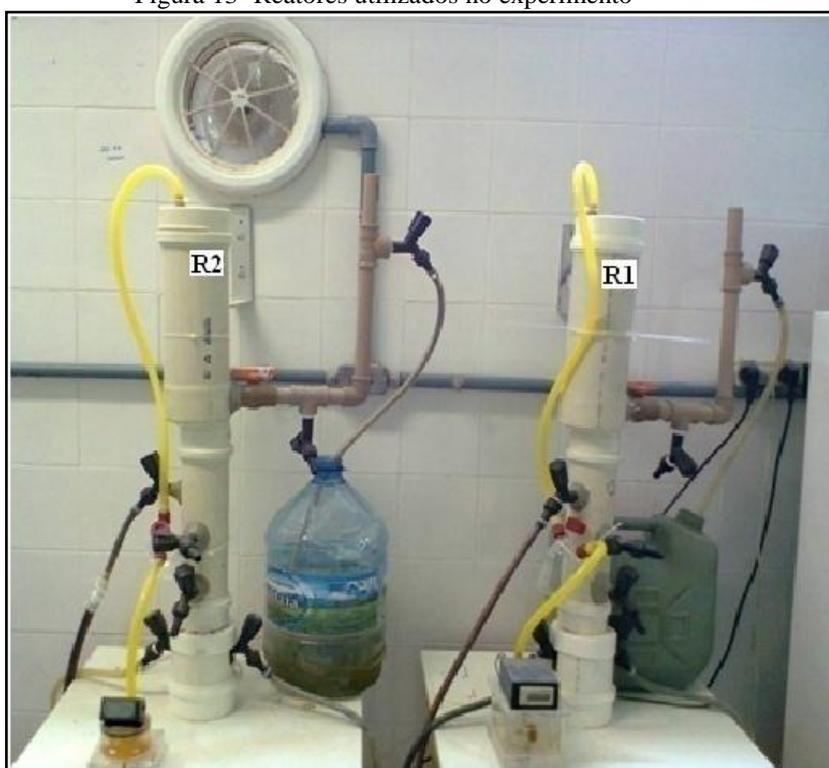
Fonte: Autora

4.4 Reatores: Configuração e operação

Foram utilizados dois reatores do tipo UASB modificado (dotados de sistema de recirculação e separador de fases), confeccionados em tubos e conexões de PVC, com diâmetro interno de 75 mm na parte inferior e 100 mm na parte superior e volume útil de aproximadamente 3,40 litros. Os reatores apresentavam um sistema de recirculação do efluente para aumento da velocidade ascensional do afluente, utilizando

bombas dosadoras (*ProMinent*, modelo *Concept Plus CNPA 1000 NPB2 00A01*), atingindo uma velocidade total de 0,50 m/h. O primeiro reator, denominado R1, foi alimentado com microalga bruta e o segundo reator, denominado R2, foi alimentado com microalga submetida à pré-tratamento térmico por 30 minutos, em autoclave, ambos em co-digestão com o glicerol. A Figura 13 mostra os reatores R1 e R2 utilizados no experimento.

Figura 13- Reatores utilizados no experimento



Fonte: Autora

Nota: R1 – reator contendo microalgas brutas com glicerol.

R2 – reator contendo microalgas submetidas a pré-tratamento térmico.

Os afluentes que alimentavam os reatores eram armazenados em reservatórios de PVC, mostrados na Figura 14, com volume de aproximadamente 7 litros e mantidos abertos para alimentação direta. Os afluentes eram mantidos sob agitação, com auxílio de agitadores magnéticos (Marca Fisatom, modelo 752), e refrigeração de aproximadamente 5°C, para evitar possível proliferação de micro-organismos, o que degradaria prematuramente o afluente. A alimentação de ambos os

reatores foi auxiliada pelo uso de uma bomba peristáltica (Minipuls 3, marca Gilson) com vazão média de 2,0 L/d e TDH de aproximadamente 40 h; os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente de aproximadamente 28°C.

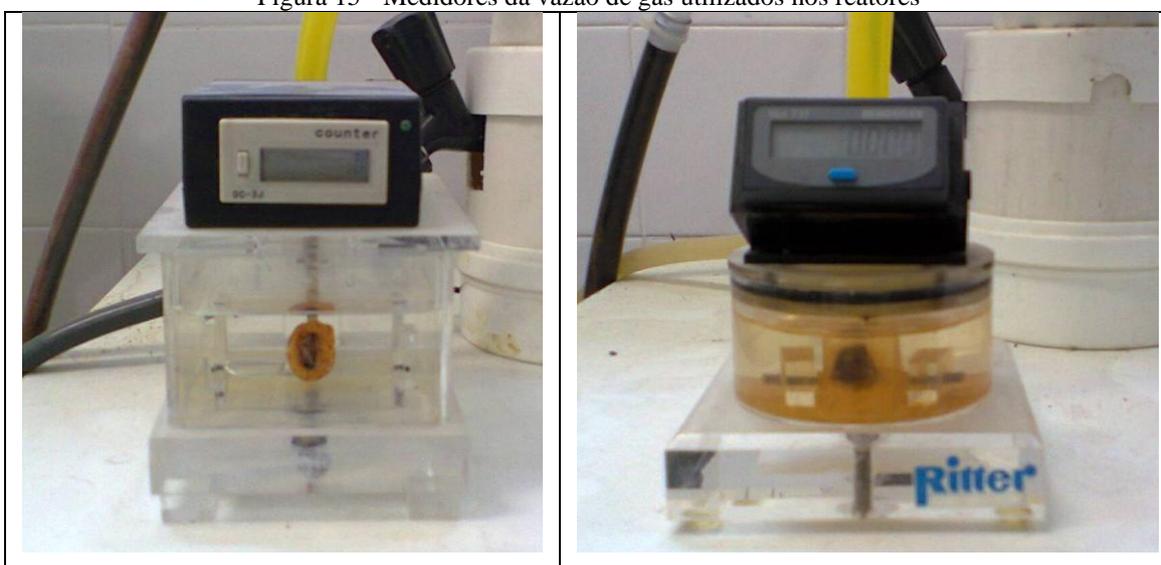
Figura 14 - Reservatórios de armazenamento dos afluentes (alimentação)



Fonte: Autora

Inicialmente, houve a intenção de medir a vazão de biogás diário produzido nos reatores, utilizando medidores de gás, os quais a cada volume fixo de biogás produzido registravam num display digital pulsos equivalentes a determinado volume em mL (Hengstler, modelo Tico 731) ou volume fixo produzido (Ritter, Mili Counter, modelo DC-3J) em mL, porém os medidores não apresentaram estabilidade durante a fase experimental, provavelmente devido à baixa produção de biogás, o que impossibilitou a medição. Os medidores são mostrados na Figura 15.

Figura 15 - Medidores da vazão de gás utilizados nos reatores



Fonte: Autora

Nota: À esquerda: medidor de gás da marca Ritter Mili Counter, modelo DC-3J

À direita: medidor de gás da marca Hengstler, modelo Tico 731.

Apesar de não ter sido possível medir a vazão do biogás, foi realizada a sua caracterização e quantificação por meio de cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo GC 17A, marca Shimadzu, com detector de condutividade térmica (TCD), mostrado na Figura 16, com especificações listadas na Tabela 14, conforme metodologia de Carneiro (2012).

Tabela 14 - Condições cromatográficas do GC/TCD utilizadas na análise do biogás no teste de AME

Parâmetros GC-TCD	
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Volume de injeção (mL)	1
Temperatura do injetor (°C)	40
Gás de arraste	He
Fluxo na coluna (mL/min)	0,7
Temperatura do forno (°C)^a	50
Temperatura do detector (°C)	200
Tempo de corrida (min)	5

Fonte: Carneiro (2012)

Figura 16 - Cromatógrafo gasoso GC 17A – Shimadzu



Fonte: Autora

4.5 Experimentos em fluxo contínuo

Os experimentos foram realizados nas instalações do Laboratório de Saneamento (LABOSAN), do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi aplicado o uso de reatores

anaeróbios para tratamento de microalgas em co-digestão com glicerol para produção de metano.

Os reatores foram inicialmente inoculados com 1 litro de lodo de inóculo, com as características descritas na Tabela 10 e, em seguida, alimentados com solução de glicose com DQO 4,5 g/L para ativação do consórcio microbiano (adaptação).

A parte experimental foi desenvolvida em quatro fases. A divisão em fases teve como objetivo principal avaliar a melhor relação DQO/N aplicada aos digestores, sendo as microalgas, micro-organismos ricos em proteínas e consequentemente ricos em nitrogênio (BROWN *et al.*, 1997), e o glicerol a principal fonte de DQO e consequentemente, fonte de carbono. Ambos os substratos foram caracterizados. As fases estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15- Resumo do experimento de acordo com os substratos utilizados e relações DQO/N.

Fases	Substratos	Relação DQO/N
Adaptação	Glicose	-
1ª Fase	Microalgas	-
2ª Fase	Microalgas + Glicerol	20
3ª Fase	Microalgas + Glicerol	40
4ª Fase	Microalgas + Glicerol	70

Fonte: Autora

Durante o experimento, aos afluentes não foram adicionados macro e micronutrientes, partindo do pressuposto de que as microalgas têm uma vasta composição mineral, podendo por si só atender as necessidades nutricionais do consórcio microbiano anaeróbio (SIALVE *et al.*, 2009).

As microalgas, após a coleta nas lagoas de estabilização, foram separadas em duas amostras distintas; a primeira amostra foi utilizada na forma bruta e alimentava diretamente o R1; a segunda amostra foi submetida a tratamento térmico por 30 minutos e após o resfriamento, foi utilizada como alimentação do R2.

O experimento como todo durou 123 dias. Para fase de adaptação, os reatores foram operados durante 9 dias apenas com glicose, macronutrientes,

micronutrientes e bicarbonato de sódio. Durante a adaptação, os reatores foram acompanhados e monitorados com ensaios físico-químicos e determinação da composição de biogás, apenas para avaliar a atividade do inóculo.

Na primeira fase, os reatores foram alimentados apenas com as microalgas, para remoção de traços de glicose, utilizada na adaptação dos reatores, e sem a adição de nutrientes e tampão. A tentativa de realizar o experimento de degradação anaeróbia sem adição de nutrientes e tampão se justifica pelo que foi sugerido por Viana (2011), que citou a alternativa como uma possível redução nos custos com reagentes. Essa etapa durou 19 dias e foi monitorada com ensaios físico-químicos e determinação da composição do biogás.

Na segunda fase do experimento, o glicerol foi adicionado às microalgas numa relação DQO/N de 20, tomando como base a média aritmética dos valores de NTK e NH_4^+ das microalgas, determinados ao longo da primeira fase do experimento. Os parâmetros eram determinados 3 dias por semana.

Na terceira fase, a relação DQO/N foi novamente aumentada para 40 e posteriormente, na quarta fase esse valor foi aumentado para 70.

4.6 Ensaios

Durante toda a fase experimental com os reatores, foram realizadas algumas análises de controle e avaliação da produção de biogás. Dentre os ensaios, está a análise de NH_3 e H_2S , utilizando um medidor de gases (Dräger X-am 5600). No ensaio, coletaram-se 20 mL de biogás de cada reator e injetavam-se no bulbo de vidro de 125 mL, de modo a diluir o biogás com o ar dentro do bulbo. O bulbo era conectado ao medidor de gases, onde ocorria uma sucção do gás dentro do bulbo por uma bomba, até o biogás chegar ao detector, realizando a leitura de NH_3 e H_2S , registrados no display.

Na Tabela 16 estão listados os ensaios de controle realizados durante o experimento, bem como os métodos utilizados e respectivas referências.

Tabela 16 - Parâmetros monitorados na fase experimental

Parâmetros	Frequência semanal	Método	Referência
Temperatura	Diário	2550 B	APHA (2005)
pH	Diário	4500-HB	APHA (2005)
AGV	1	Kapp	Ribas, Moraes, Foresti (2007)
Alcalinidade	1	2320 B	APHA (2005)
DQO total	3	5220 C	APHA (2005)
DQO filtrada	3	5220 C	APHA (2005)
SST	1	2540 D	APHA (2005)
SSV	1	2540 E	APHA (2005)
N-NH₃	3	4500-NH ₃ B	APHA (2005)
NTK	3	4500-N _{org} C	APHA (2005)
Clorofila A	1	10200 H	APHA (2005)

Fonte: Autora

4.7 Tratamento estatístico

Na avaliação da degradação anaeróbia da carga orgânica, em todas as fases do experimento, foram aplicados testes estatísticos para análise exploratória dos dados (avaliação de valores discrepantes, testes de aderência à distribuição normal) e para comparação de médias. Esses testes foram realizados utilizando-se das rotinas estatísticas do programa computacional Statgraphics® Centurion XV (StatPoint, Inc).

A avaliação de dados discrepantes é fundamental em qualquer análise exploratória de dados, pois tais valores podem fornecer informações importantes ou afetar fortemente algumas estatísticas, como a média e o desvio padrão, como também podem distorcer a distribuição dos dados amostrais, comprometendo assim, testes estatísticos que dependam destas características (TRIOLA, 2008). Neste contexto, a avaliação dos valores atípicos se baseou na diferença dos valores em relação ao intervalo interquartil para cada conjunto de dados.

Os testes de aderência usados para testar se a distribuição dos dados poderia assumir uma distribuição normal foram: o teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) e o teste de Shapiro-Wilk (S-W). Estes testes comparam os valores dos escores (variável) de uma amostra a uma distribuição normal de mesma média e variância dos valores amostrais. Assim, se o teste é não significativo ($p \geq 0,05$) ele informa que os dados da amostra não diferem significativamente de uma distribuição normal, isto é, eles provavelmente se apresentam na forma desta distribuição. Caso contrário, a distribuição é significativamente distinta da distribuição normal (REIMANN *et al.*, 2008; TRIOLA, 2008).

Na avaliação da influência das características dos reatores usados nos ensaios experimentais na remoção dos parâmetros monitorados, nas diferentes fases do estudo, testes de comparação de médias foram aplicados aos grupos de dados. Neste contexto, foram utilizados dois testes de comparação de médias: o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Estes testes não-paramétricos, por não estarem condicionados a qualquer distribuição de probabilidades dos dados em análise, foram realizados devido ao número reduzido de dados obtidos durante a fase de experimentação.

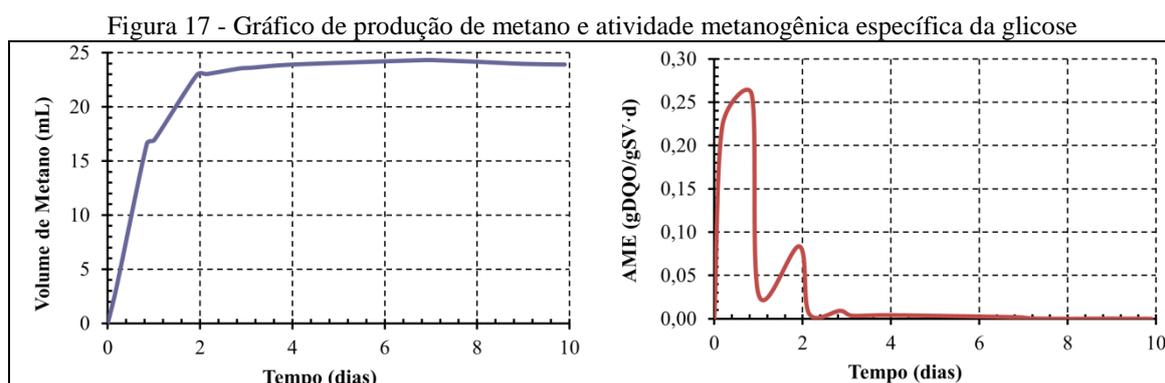
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do teste de atividade metanogênica específica do lodo

O teste de AME foi realizado com o objetivo de obter uma estimativa de carga máxima suportada pelo lodo de inóculo utilizado nos reatores, evitando sobrecargas e possíveis problemas de operação relacionados a tal consequência, além de facilitar a partida dos reatores.

Para os testes realizados no presente trabalho, a glicose apresentou a maior atividade metanogênica específica, comparada aos AGV, semelhante aos resultados obtidos por Viana (2011).

A atividade metanogênica específica média obtida e o volume de metano produzido nos testes podem ser visualizados nos gráficos da Figura 17.



Fonte: Autora

De acordo com o gráfico da Figura 17, o lodo de inóculo utilizado no presente estudo, quando submetido a teste de AME utilizando o substrato glicose, apresentou um valor médio de 0,26g DQO/g SSV.d em menos de 1 dia, um valor superior ao encontrado por Souto *et al.* (2010), que obteve um valor de 0,11 g DQO/g

SSV.d, utilizando a relação alimento/microrganismo de 0,2, bem como também aos encontrados por Chamy e Ramos (2011), que obtiveram AME de dois lodos distintos, com valores de 0,14 e 0,17 g DQO/g SSV.d respectivamente. O valor médio encontrado nesse trabalho foi inferior aos encontrados por Viana (2011), que obteve AME de 0,72 g DQO/g SSV.d e por Carneiro (2012) que obteve AME de 0,63 g DQO/g SSV.d.

Para o teste realizado com glicose, foi avaliada durante o experimento a quantidade de metano no biogás, por análise cromatográfica, obtendo-se até 72% de metano no biogás.

O valor de AME observado no teste utilizando AGV como substrato não apresentou um valor satisfatório, o que pode ser explicado pelo maior tempo necessário para conversão dos ácidos propionato e butirato a acetato, antes da conversão a metano, visto que os micro-organismos metanogênicos não convertem tais ácidos diretamente a metano ou pela inibição causada pelo excesso de AGV adicionados inicialmente ao ensaio. A AME quanto à utilização de AGV como substrato pode até mesmo ser usada como teste da capacidade sintrófica do lodo de inóculo, baseado na importância de que o sistema anaeróbio só terá boa operação se os micro-organismos sintróficos também tiverem boa atividade (AQUINO *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com Steil *et al.* (2004)(apud AQUINO *et al.*, 2007), a relação A/M pode influenciar bastante na atividade quanto ao teste utilizando AGV, que segundo os autores, a melhor relação A/M encontrada em seus experimentos foi de 0,25 g DQO/g SSV.d, diferente da relação adotada no presente trabalho, que foi de 0,5 g DQO/g SSV.d.

A atividade metanogênica utilizando AGV foi inibida durante os primeiros 15 dias de incubação, o que pode ser confirmado pelo percentual de metano observado nos frascos nesse período, apenas 17% e pelo baixo valor de AME (0,02 g DQO-CH₄/g SSV.d) durante o experimento.

Quando se conhecem os valores da atividade do lodo e se sabe a concentração de biomassa no experimento, pode-se ter uma estimativa da quantidade máxima de DQO por unidade de tempo que um lodo anaeróbio é capaz de degradar (CARNEIRO, 2012). Portanto, a carga máxima que pode ser aplicada ao lodo em estudo foi determinada utilizando o valor de AME obtido com a glicose, o qual

apresentou uma carga de aproximadamente 9,6 g DQO/L.d, dado importante para a partida (start-up) dos reatores anaeróbios utilizados neste estudo.

5.2 Teste de biodegradabilidade

O teste de biodegradabilidade foi realizado com o objetivo de selecionar um método de pré-tratamento a ser aplicado às microalgas durante a fase experimental utilizando os reatores, visando avaliar a influência do pré-tratamento na produção de biogás, em especial, produção de metano, bem como comparar a potencial degradação anaeróbia de microalgas pré-tratadas com as microalgas na forma bruta. O pré-tratamento é importante nesse caso devido ao caráter resistente da parede celular das microalgas frente a micro-organismos anaeróbios, dificultando a primeira etapa da digestão, qual seja, a hidrólise.

Nesse caso, o pré-tratamento foi aplicado para promover a hidrólise da parede celular microalgal, com o objetivo de tornar o material mais acessível aos micro-organismos participantes do processo como todo (SIALVE *et al.*, 2009).

Na Tabela 17, encontram-se os níveis de trabalho e as respostas, em termos de produção de metano (mL), do planejamento experimental fatorial multivariado empregado nos estudos dos tipos de pré-tratamentos, bem como o tempo de exposição.

Tabela 17 - Planejamento fatorial 2² para otimização das condições estudadas

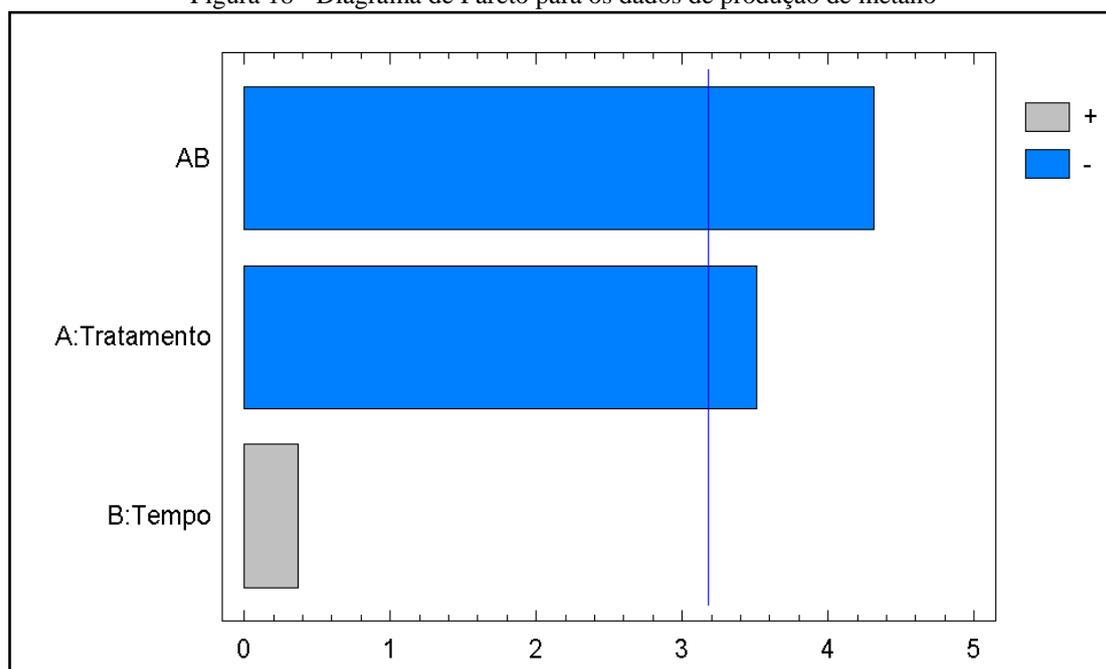
Variável	Nível (-1)	Nível (+1)	
Tipo de pré-tratamento	Térmico	Ultrassônico	
Tempo de exposição (minutos)	30	90	
Experimentos	Níveis		Resposta (mL de CH ₄)
	Pré-tratamento	Tempo de exposição	
1	-1	-1	20,6
2	-1	+1	22,8
3	+1	-1	21,1
4	+1	+1	18,6
5	-1	-1	19,9
6	-1	+1	24,7
7	+1	-1	20,6
8	+1	+1	17,2

Fonte: Autora

Com os resultados obtidos pelo Statgraphics® Centurion XV foi gerado o diagrama de pareto, com intervalo de confiança de 95%, como pode ser observado na Figura 18. Pode-se observar que houve efeito significativo da variável tipo de pré-tratamento, bem como para o efeito secundário das variáveis, que pode ser explicado pela considerável influência que apresenta o tipo de pré-tratamento. Portanto, para as condições estudadas foi verificado o aumento da produção de metano com o tipo de pré-tratamento.

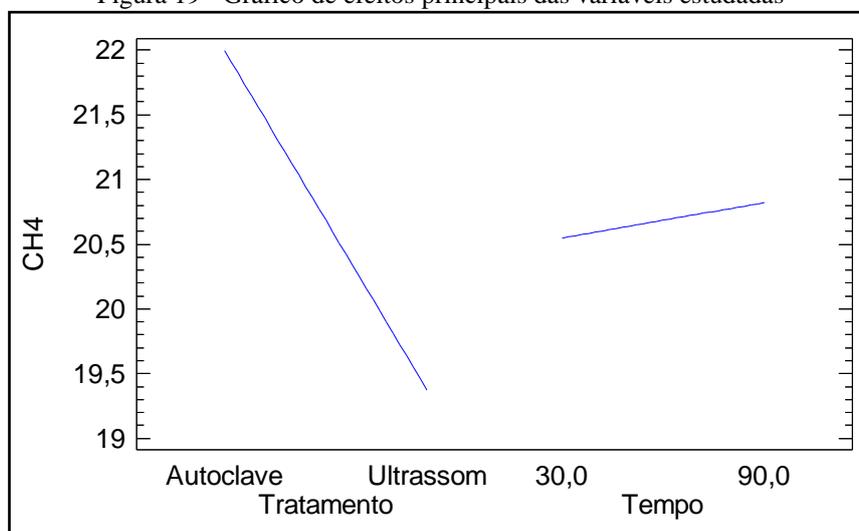
Ao analisar o diagrama de pareto da Figura 18, percebe-se que aumentando o tempo de exposição, os valores de produção de metano foram ligeiramente maiores, no entanto, como foi visto anteriormente, esse pequeno aumento não teve influência estatística significativa. Em relação ao tipo de pré-tratamento utilizado, se pode observar que existe uma diferença significativa entre os dois tipos testados, sendo o pré-tratamento térmico (autoclave) que apresentou maior produção de metano. A Figura 19 mostra um gráfico que analisa o quão significativos são os fatores analisados.

Figura 18 - Diagrama de Pareto para os dados de produção de metano



Fonte: Autora

Figura 19 - Gráfico de efeitos principais das variáveis estudadas



Fonte: Autora

Nas condições estudadas, o tipo de pré-tratamento influenciou significativamente na produção de metano, sendo os melhores resultados obtidos com tratamento térmico (autoclave) e 30 minutos de exposição. Baseado nesse resultado, o pré-tratamento térmico por 30 minutos foi selecionado para ser aplicado ao reator UASB utilizado no experimento.

5.3 Operação e monitoramento dos reatores em escala laboratorial

5.3.1 Parâmetros operacionais dos reatores durante as fases estudadas

Durante a fase experimental, os reatores foram monitorados diariamente para avaliação de parâmetros operacionais tais como pH, vazão do efluente, temperatura, potencial de óxido-redução (ORP), condutividade e sólidos dissolvidos totais (TDS). A Tabela 18 expõe um resumo dos valores médios dos principais parâmetros obtidos durante a fase operacional dos reatores, para cada fase do experimento.

Na fase 1, os reatores foram alimentados apenas com microalgas, a fim de remover traços de glicose utilizada nos reatores para ativação da biomassa. Nessa fase, de acordo com a Tabela 18, os valores de pH mantiveram-se acima de 7, o que pode ser explicado pela adição de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) durante a adaptação com glicose, restando ainda nessa fase traços de NaHCO_3 , o que conferiu esse valor de pH em ambos os reatores. Essa fase durou 27 dias, incluindo adaptação e alimentação com microalgas.

Na fase 2, os reatores foram alimentados com microalgas e glicerol, de modo a obter uma relação DQO/N de 20, baseado na DQO que praticamente foi fornecida apenas pelo glicerol e apenas traços pelas microalgas, e no nitrogênio, fornecido pelas microalgas, obtidas a partir da determinação de NTK e NH_4^+ das mesmas. A fase 2 teve duração de 35 dias. Nas fases 3 e 4, essa relação foi aumentada para 40 e 70, respectivamente, durando cada fase 30 e 34 dias, respectivamente. O experimento completo teve duração de 123 dias.

Todas as fases foram conduzidas sem adição de macro e micronutrientes, sendo essa necessidade do consórcio microbiano suprida apenas pela composição das microalgas, conforme citado por Brown *et al.* (1997).

Durante as três primeiras fases, foi possível a operação dos reatores sem adição de bicarbonato, sendo possível a manutenção do pH em níveis aceitáveis para a

digestão anaeróbia, porém na 4ª fase observou-se uma diminuição brusca do pH, que ficou em torno de 4,5, o que justificou a opção de adicionar bicarbonato de sódio aos reatores nessa fase, para evitar o azedamento do reator, o que poderia causar problemas irreversíveis no sistema. Essa diminuição brusca do pH pode ter sido ocasionada pela produção dos AGV ser superior ao seu consumo pelos micro-organismos acetogênicos e arqueias metanogênicas, causando acúmulo desses AGV, e consequentemente provocando diminuição no valor de pH (CHERNICHARO, 1997). Os valores de pH nesse trabalho, quando realizada a operação dos reatores sem adição de bicarbonato, mantiveram-se menores que os valores de pH encontrados por Siles *et al.* (2010), que obtiveram durante o experimento um pH aproximadamente constante com valor médio de $7,83 \pm 0,20$, utilizando o glicerol co-digerido com águas residuárias provenientes da própria produção de biodiesel. A Tabela 18 mostra os valores médios de vazão, pH, temperatura e ORP determinados durante as 4 fases.

Tabela 18 - Parâmetros avaliados durante a operação dos reatores

REATOR	FASE	DQO/N	VAZÃO (L/d)	pH	TEMP. (°C)	ORP
1	1	-	$1,55 \pm 0,19$	$7,72 \pm 0,59$	$28,76 \pm 0,53$	-197 ± 54
	2	20	$1,36 \pm 0,46$	$6,62 \pm 0,13$	$29,62 \pm 0,45$	-238 ± 32
	3	40	$1,66 \pm 0,33$	$6,36 \pm 0,22$	$29,45 \pm 0,54$	-188 ± 61
	4	70	$1,40 \pm 0,27$	$6,78 \pm 0,51$	$28,73 \pm 0,74$	-159 ± 61
REATOR	FASE	DQO/N	VAZÃO	pH	TEMP.	ORP
2	1	-	$1,52 \pm 0,09$	$7,69 \pm 0,53$	$28,92 \pm 0,35$	-168 ± 45
	2	20	$1,40 \pm 0,41$	$6,79 \pm 0,11$	$29,49 \pm 0,42$	-214 ± 44
	3	40	$1,53 \pm 0,39$	$6,68 \pm 0,55$	$29,17 \pm 0,51$	-165 ± 47
	4	70	$1,30 \pm 0,26$	$7,10 \pm 0,52$	$28,67 \pm 0,67$	-165 ± 71

Fonte: Autora

Nota: ORP – potencial de óxido-redução

A partir da Tabela 18, observa-se que à medida que as relações DQO/N eram aumentadas, a tendência do pH era diminuir, pois o aumento da carga orgânica ocasionada pelo aumento da DQO provocava o aumento na produção de AGV, sendo que nas fases 1, 2 e 3, a alcalinidade era mantida sem adição de NaHCO_3 . Na fase 4, como já mencionado anteriormente, houve necessidade de adição de NaHCO_3 , devido a

queda brusca de pH, por isso houve um aumento do pH nessa fase, mantendo as condições ótimas para digestão anaeróbia. Os valores de ORP mantiveram-se abaixo de -150, o que indica condições propícias para a digestão anaeróbia, porém esse parâmetro não apresentou diferenças significativas na comparação de ambos os reatores, tendo caráter redutivo semelhante.

5.3.2 Demanda química de oxigênio

As DQO de entrada e saída foram monitoradas três vezes por semana durante todas as fases, visando acompanhar a estabilidade dos reatores. Foi feita uma avaliação quanto à eficiência de remoção frente às cargas que os reatores recebiam em cada fase, separadamente. Na Tabela 19, da página 72, são mostradas as DQO afluente, efluente e a eficiência de remoção para os reatores.

Durante a 1ª fase experimental, como o objetivo principal do experimento era remover aos poucos a glicose utilizada na adaptação, as eficiências de remoção de DQO não apresentaram valores satisfatórias, visto que a DQO de entrada, representada apenas pela DQO das microalgas, era bem menor que a DQO de saída, com quantidades de glicose adicionada aos reatores numa concentração de 4,5 g DQO/L, ainda sendo removidas no efluente dos reatores.

Nas fases restantes, as eficiências de remoção variaram de 40% a 98%. As cargas orgânicas volumétricas aplicadas aos reatores foram em torno de 0,06 kg DQO/m³.d para a primeira fase, 0,21 kg DQO/m³.d para a segunda fase, 0,42 kg DQO/m³.d para a terceira fase e 0,75 kg DQO/m³.d para a quarta fase. Os valores de remoção de DQO foram inferiores aos apresentados por Viana (2011), que utilizou COV variando de 4 a 10 kg DQO/m³.d, utilizando como substrato apenas o glicerol residual do biodiesel, obtendo remoção acima de 90%. Ele enfatizou que houve no experimento a necessidade de utilizar nutrientes, bem como a importância da concentração desses nutrientes, sendo esse um fator limitante para a digestão anaeróbia de glicerol residual. Ao aumentar a concentração de nutrientes, o mesmo comprovou maior estabilidade no reator, permitindo também a aplicação de maiores COV.

Contrim (2009) trabalhou com tratamento anaeróbio para tratar efluente do processo de produção de biodiesel, adicionando apenas NaHCO_3 à água residuária utilizada como substrato, o qual continha também glicerol, fazendo presumir que não foram utilizados macro e micronutrientes, semelhante ao presente trabalho. Nesse experimento foi alcançada remoção de DQO de até 95% para uma concentração afluente de 500 mg DQO/L ($\text{COV} = 0,60 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$) e eficiência de 73%, para concentração afluente de 2000 mg DQO/L ($\text{COV} = 2,44 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$).

Yang *et al.* (2008) aplicaram COV variando de 0,25 a 1,00. Os autores alcançaram remoção de DQO de até 87% utilizando como substrato um afluente sintético de glicerol e nutrientes. Ras *et al.* (2011) trabalharam com a digestão anaeróbia de *Chlorella vulgaris* e obtiveram remoções de DQO solúvel de 51%, com TDH de 28 dias e produção de metano de 240mL/g SSV.

No presente trabalho, não foi utilizada a adição de nutrientes aos reatores, na tentativa de observar se os nutrientes exigidos pela microflora anaeróbia poderiam ser supridos apenas pela composição de microalgas (efluente de lagoa de estabilização). Durante toda a fase experimental, foi possível operar os reatores sem adição de macro e micronutrientes, além da não adição de NaHCO_3 até o final da fase 3, obtendo-se remoções significativas de DQO (valores próximos a 60%).

O efeito do pré-tratamento realizado nas microalgas mostrou-se bastante influente na remoção de DQO solúvel e total (Figuras 20 e 21), observando-se que as eficiências de remoções para o R2 apresentaram valores maiores, comparados ao R1, tanto pra fração total quanto pra fração solúvel. Esse efeito pode ser explicado pelo que foi enfatizado por Sialve *et al.* (2009), que destacou o pré-tratamento da biomassa microalgal como alternativa de melhorar significativamente a sua biodegradabilidade, tornando a matéria orgânica mais acessível ao consórcio microbiano e/ou aporte de nutrientes.

Os gráficos das Figuras 20 e 21 mostram as eficiências de remoção de DQO total e solúvel, respectivamente, para o R1 e R2. A partir dos gráficos, é possível observar também que a tendência de aumento de eficiência de remoção se deu com o tempo e com o aumento de cargas orgânicas, o que faz presumir que a biomassa se adaptava com o passar do tempo, apresentando um comportamento gradativo quanto às

eficiências de remoção de DQO, podendo ser observado também que esse efeito teve forte influência no percentual de metano no biogás, discutido com mais detalhes na seção 5.4.

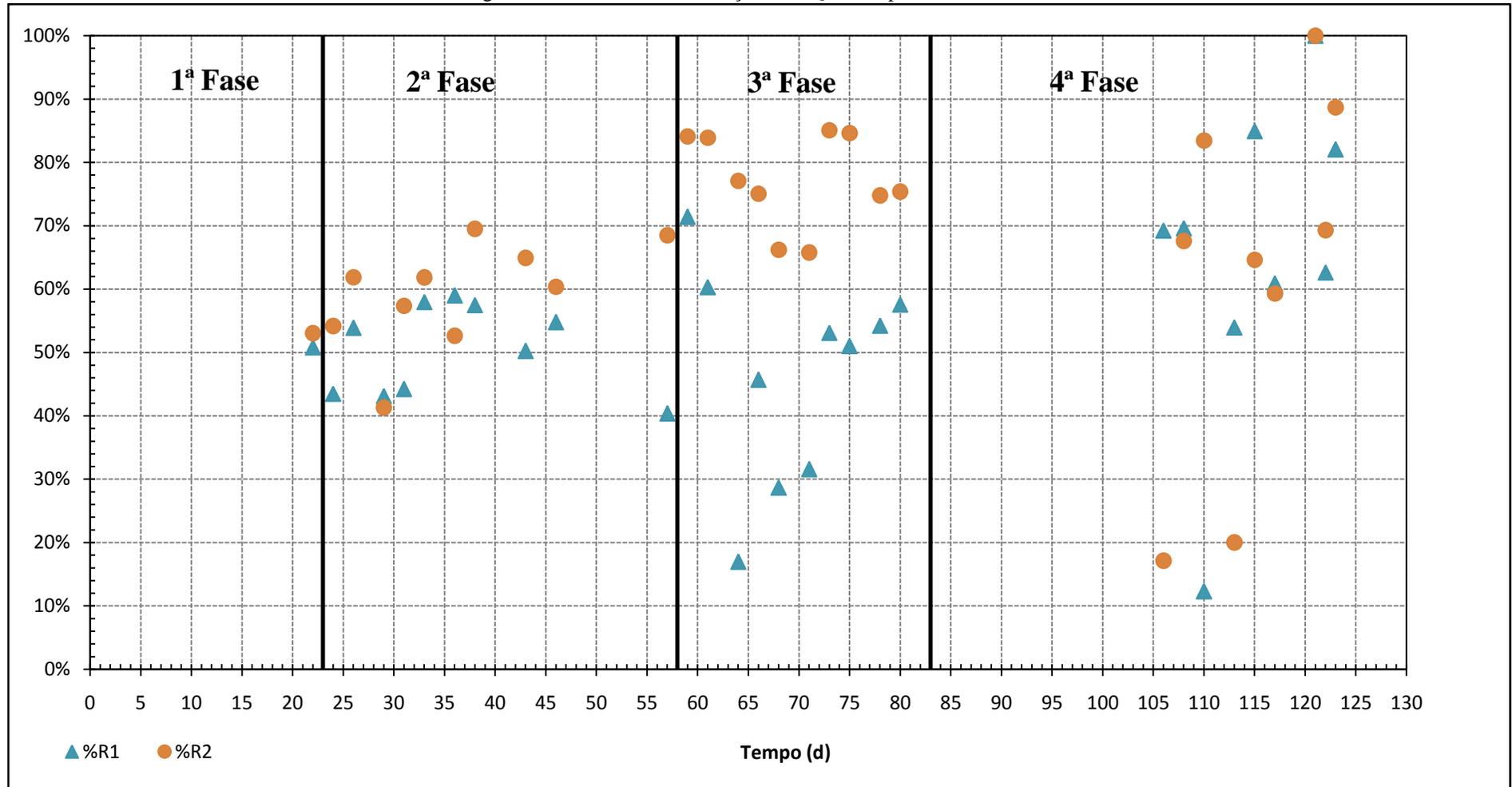
As Figuras 22 e 23 mostram as DQO total e solúvel de entrada e saída do R1 e R2, respectivamente. Tendo em vista que na fase 1 as remoções não foram satisfatórias devido a presença de glicose, que ainda estava sendo removida dos reatores, os gráficos mostram apenas valores referentes as fases 2, 3 e 4.

Tabela 19 - DQO, total e solúvel, afluente e efluente e eficiências de remoção

R1 - DQO total									R2 - DQO total									
Fase	Afluente			Efluente			ER			Afluente			Efluente			ER		
Fase 1	139	±	57,8	572	±	658	-287%	±	328%	141	±	69,5	609	±	732	-324%	±	335%
Fase 2	668	±	128	327	±	58,5	50,5%	±	7,08%	653	±	92,8	264	±	53,2	59,2%	±	8,38%
Fase 3	1.601	±	251	839	±	274	47,1%	±	16,6%	1.639	±	209	376	±	138	77,2%	±	7,26%
Fase 4	2.941	±	582	1.053	±	809	66,2%	±	24,6%	3.281	±	455	1.283	±	1055	63,3%	±	28,4%
R1 - DQO solúvel									R2 - DQO solúvel									
Fase	Afluente			Efluente			ER			Afluente			Efluente			ER		
Fase 1	73,3	±	28,0	434	±	454	-562%	±	606%	98,7	±	42,4	481	±	564	-299%	±	313%
Fase 2	609	±	79,9	307	±	87,6	49,8%	±	10,9%	604	±	119	245	±	55,6	59,3%	±	6,17%
Fase 3	1.287	±	238	528	±	147	57,9%	±	12,9%	1.359	±	201	221	±	139	84,1%	±	8,88%
Fase 4	2.675	±	611	815	±	652	72,9%	±	19,5%	3.072	±	543	601	±	540	82,6%	±	14,9%

Fonte: Autora

Figura 20 - Eficiências de remoção de DQO total para o R1 e R2.

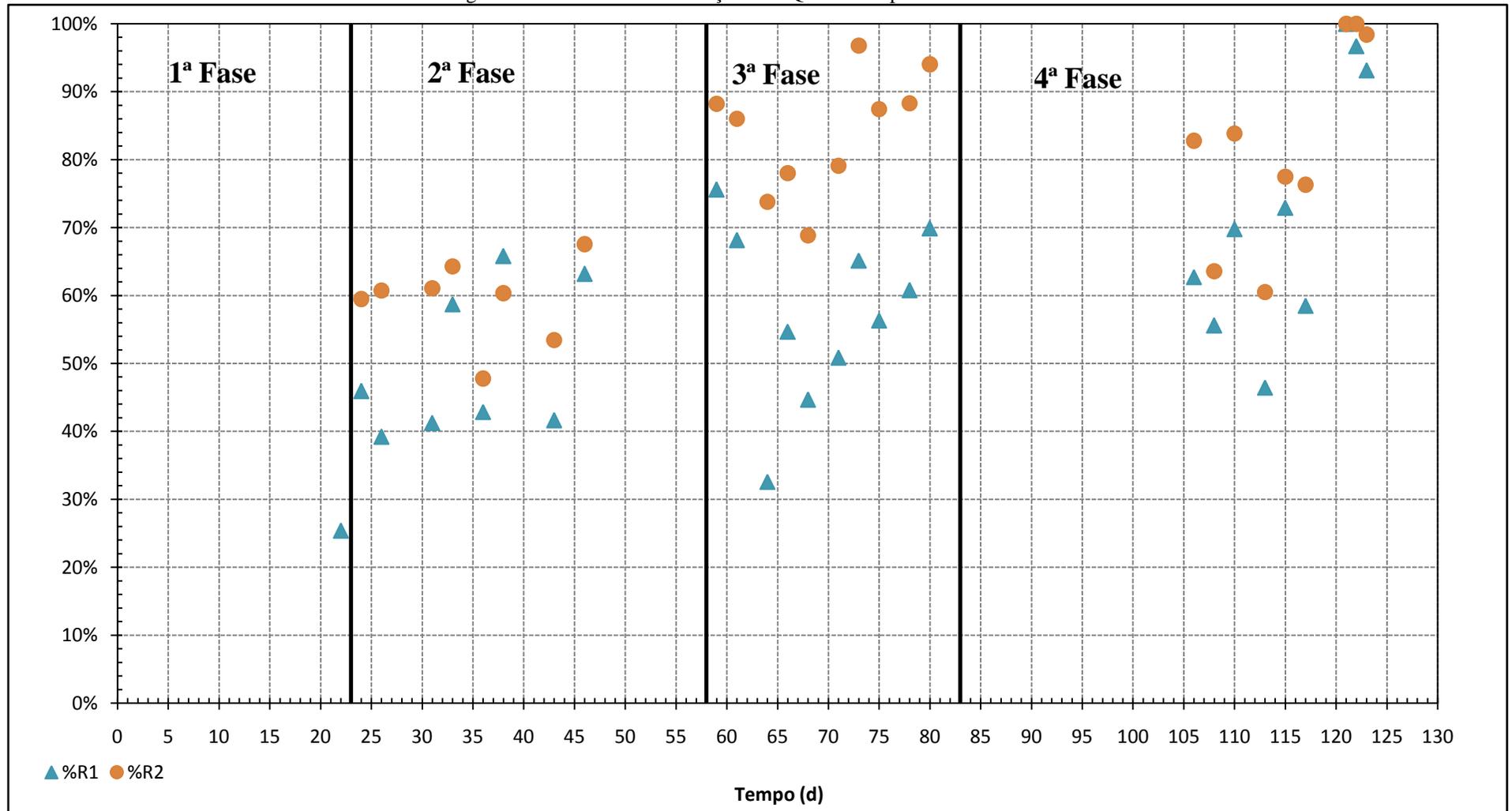


Fonte: Autora

Nota: R1 – reator 1

R2 – reator 2

Figura 21 - Eficiências de remoção de DQO solúvel para o R1 e R2.

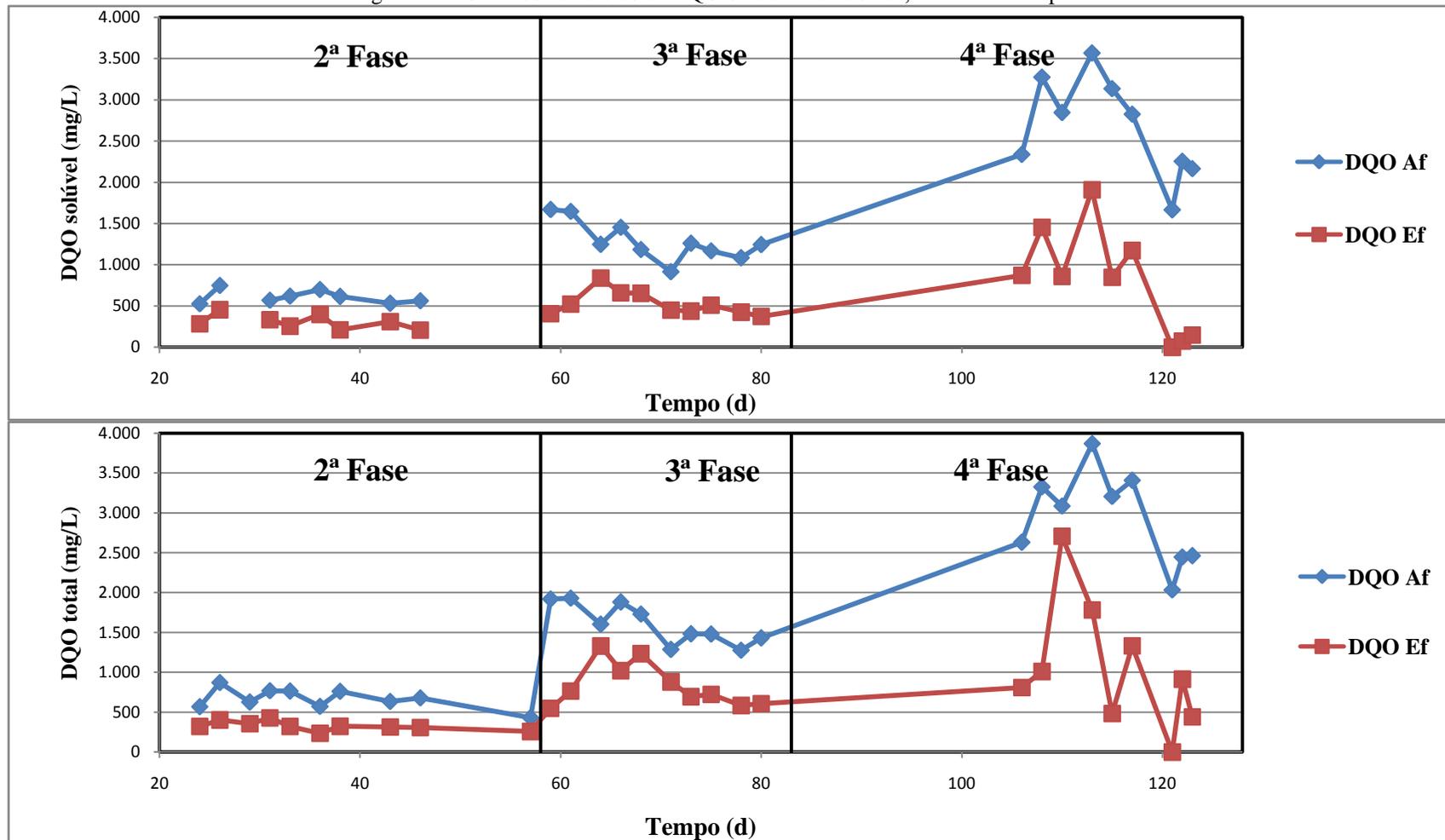


Fonte: Autora

Nota: R1 – reator 1

R2 – reator 2

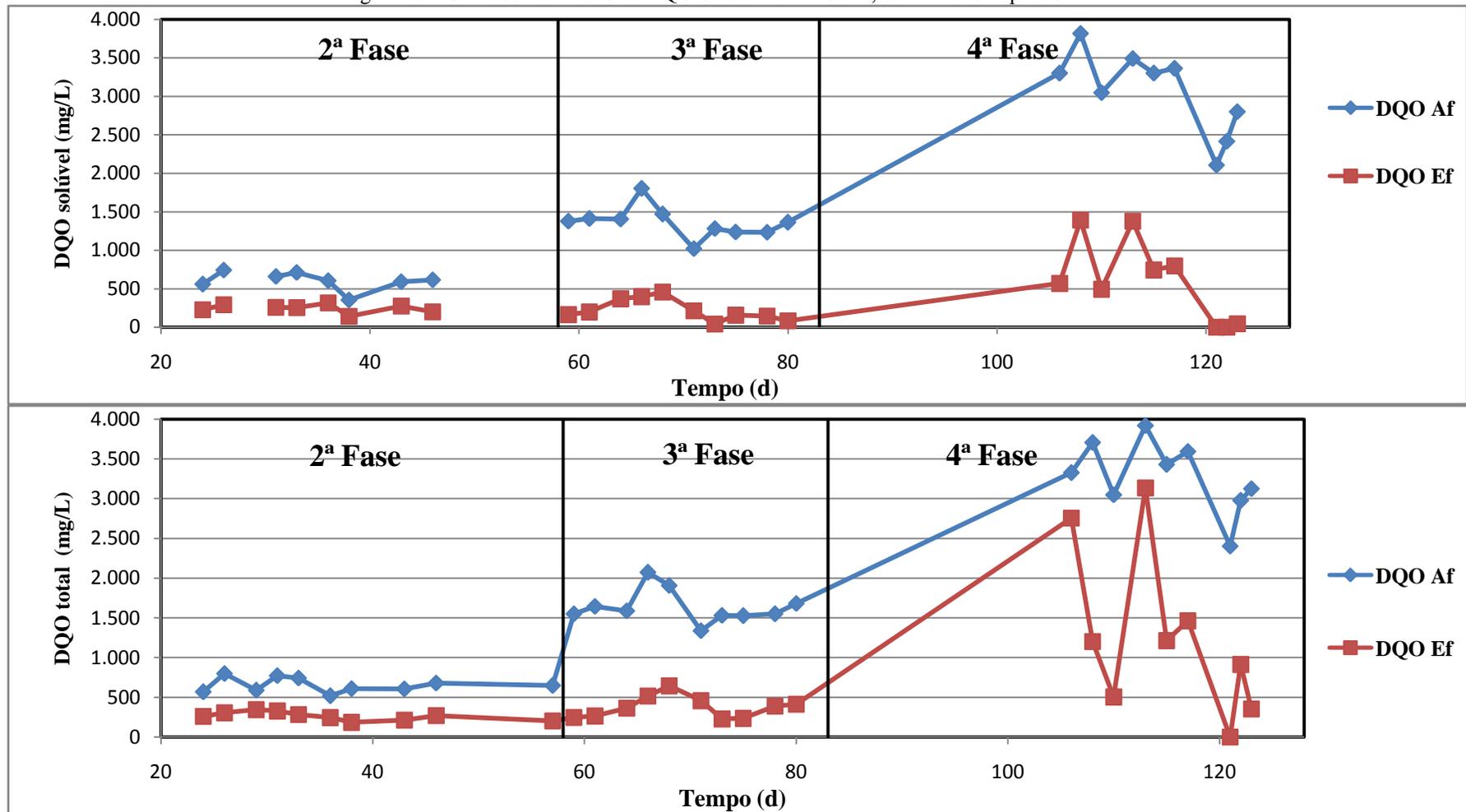
Figura 22 – Gráficos de valores de DQO's de entrada e saída, solúvel e total para o R1



Fonte: Autora

Nota: DQO Af – demanda química de oxigênio afluente; DQO Ef – demanda química de oxigênio efluente.

Figura 23 - Gráficos de valores de DQO's de entrada e saída, solúvel e total para o R2



Fonte: Autora

Nota: DQO Af – demanda química de oxigênio afluyente; DQO Ef – demanda química de oxigênio efluente.

5.3.3 NH₃ e NTK

A amônia e o NTK foram monitorados nos reatores três vezes por semana em ambos os reatores. Os resultados obtidos para amônia, que variaram de 0,5 a 25 mg/L em ambos os reatores, demonstram valores relativamente baixos de amônia no efluente, se comparados ao valor médio encontrado por Henrard *et al.* (2011), que foi de $607,41 \pm 136,46$ mg/L, utilizando a microalga *Spirulina* LEB-18 como substrato para digestão anaeróbia e produção de biogás e aos valores médios encontrados por Ras *et al.* (2011), que encontrou valores de amônia solúvel na faixa de 160 mg/L, trabalhando com TDH igual a 16 dias, digerindo a microalga *Chlorella vulgaris*.

Foram realizados ensaios para detecção de amônia na forma livre (NH₃) e ácido sulfídrico (H₂S) no biogás, porém não foram obtidos valores acima do limite de detecção do método utilizado. A amônia detectada tanto no afluente como no efluente foi apenas na forma ionizada.

Um fator das microalgas que provoca altas liberações de amônia a partir da digestão anaeróbia de microalgas é o alto teor protéico, sendo que a liberação de grandes quantidades de amônia pode ser um indicativo para avaliar a quantidade de proteínas reduzidas no reator. Altas concentrações de proteínas liberam altas concentrações de amônia, o que provoca a inibição das populações microbianas anaeróbias, tendo impacto significativo no rendimento de metano (SIALVE *et al.*, 2009).

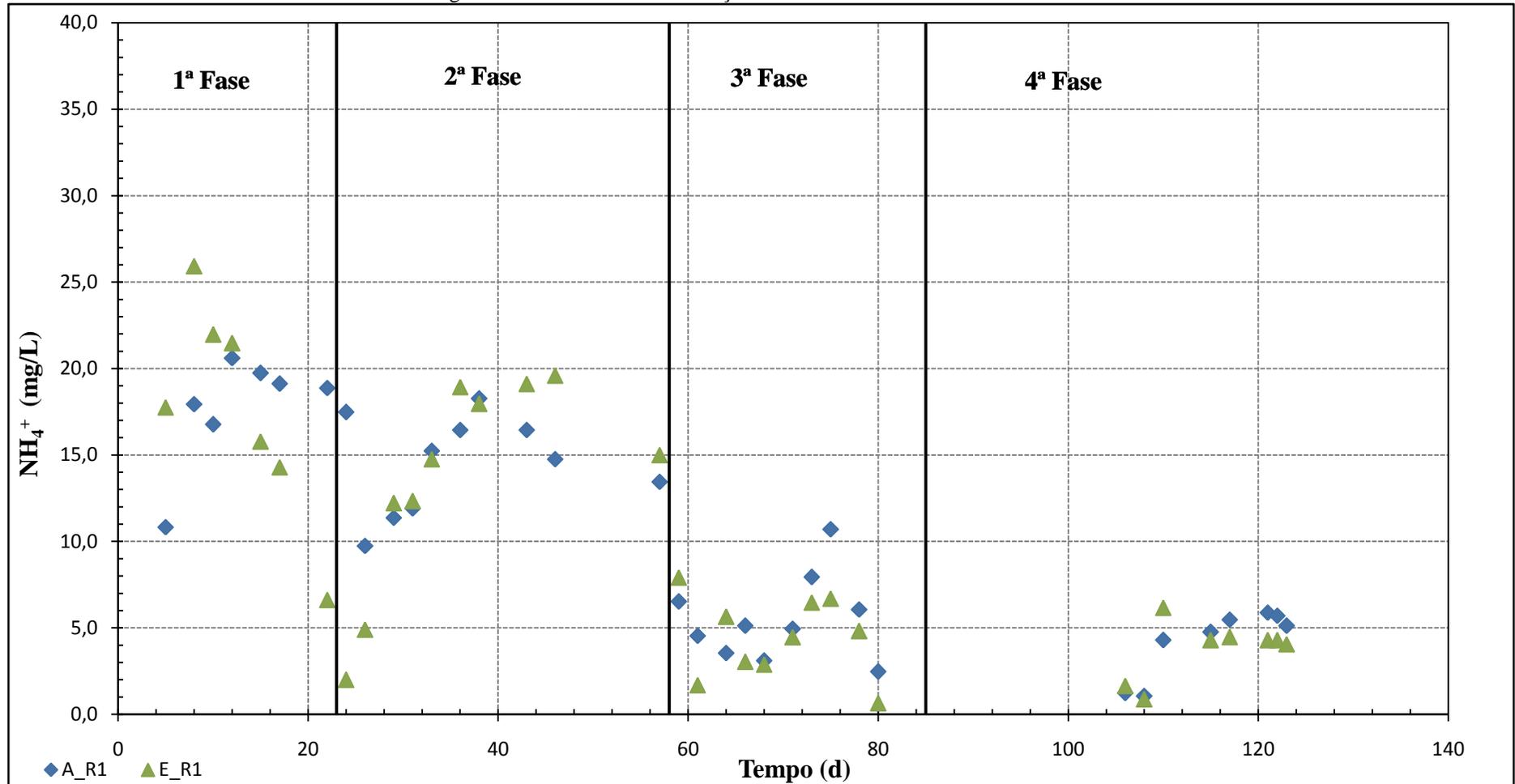
No presente trabalho, as concentrações de amônia encontradas, que basicamente foram todas na forma ionizada (NH₄⁺), são consideradas relativamente baixas, em comparação com outros trabalhos, provavelmente devido ao teor protéico ser baixo nas amostras utilizadas. Outro fator que pode representar uma influência sobre essa baixa concentração obtida é o fato de as amostras provenientes de lagoas de estabilização serem bastante diluídas e as espécies de microalgas presentes no substrato utilizado serem uma cultura mista, não fornecendo informações suficientes sobre os teores de proteínas, carboidratos e lipídios.

Segundo Yen e Brune (2007), a relação C/N tem importante influência na concentração de amônia, pois quanto menor essa relação, maior a concentração de amônia total dentro do reator. Isso é observado no presente experimento, pois com o aumento da relação DQO/N, que implica num aumento da relação C/N nos reatores, as concentrações de amônia diminuíram consideravelmente, conforme observado nos gráficos das Figuras 24 e 25. Além disso, a diminuição nessa concentração de amônia solúvel com aumento das cargas orgânicas pode ter ocorrido por assimilação pela biomassa microbiana presente no interior do reator.

A co-digestão também pode representar uma influência nas baixas concentrações de amônia, como ocorreu no experimento realizado por Yen e Brune (2007), que realizaram co-digestão de microalgas e resíduos de papel e observaram uma diminuição nas concentrações de amônia.

Os gráficos das Figuras 24 e 25 mostram as concentrações de amônia no afluente e efluente, para o R1 e R2, respectivamente.

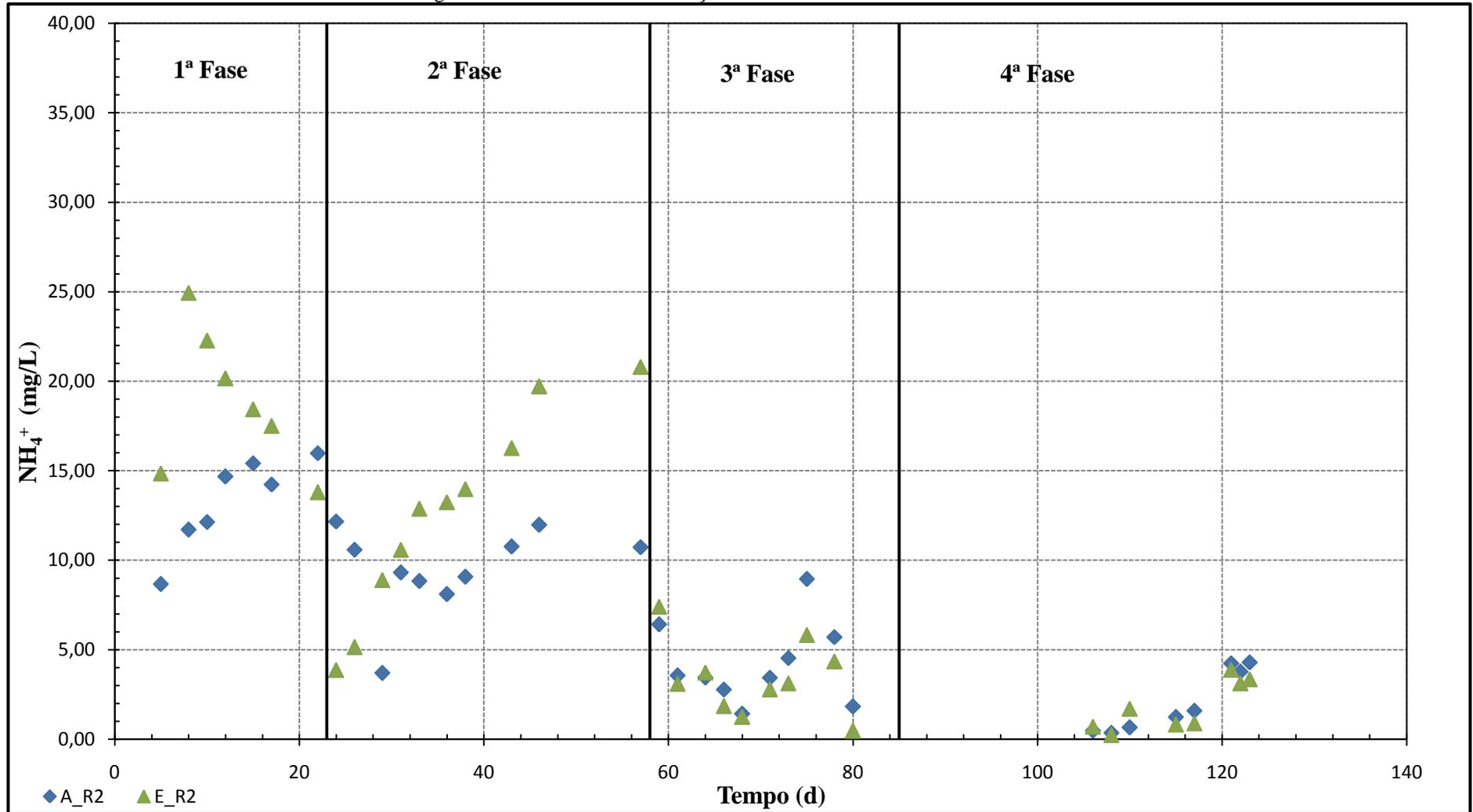
Figura 24 - Gráfico das concentrações afluente e efluente de amônia no R1



Fonte: Autora

Nota: A_R1 – afluente do reator 1; E_R1 – efluente do reator 1.

Figura 25 - Gráfico das concentrações afluente e efluente de amônia no R2



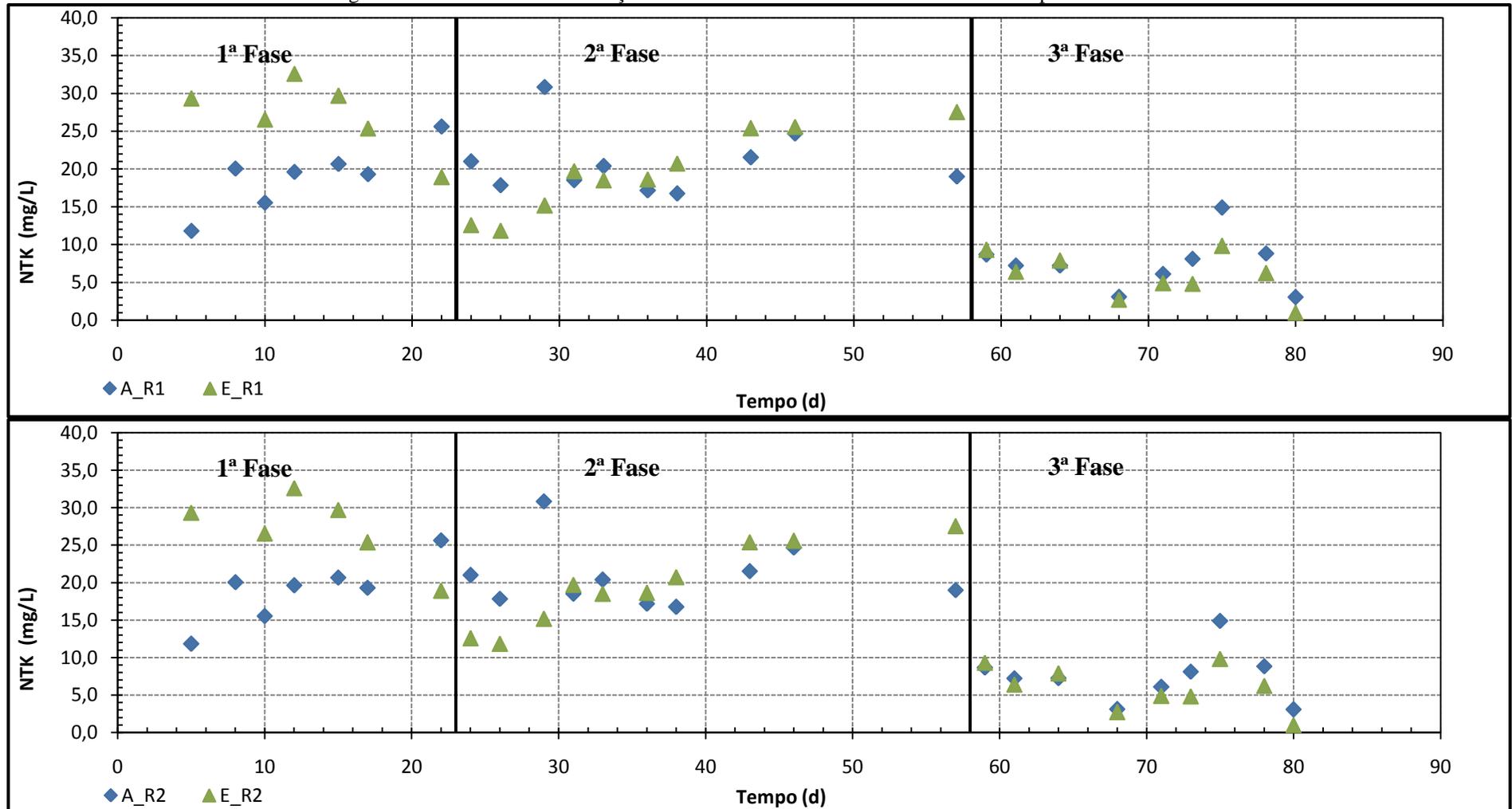
Fonte: Autora

Nota: A_R2 – afluente do reator 2; E_R2 – efluente do reator 2.

O NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl) foi monitorado durante as fases 1, 2 e 3. Na fase 4, ocorreu um problema técnico no equipamento de digestão utilizado para ensaio desse parâmetro, inviabilizando o seu acompanhamento durante essa fase. Os resultados referentes ao NTK estão expostos nos gráficos da Figura 26. A partir dos valores obtidos nos ensaios, observa-se que a tendência na diminuição dos valores com o aumento da relação DQO/N também ocorreu, semelhantemente ao que aconteceu com as concentrações de amônia. Em alguns pontos não houve remoção na maioria dos ensaios realizados, provavelmente devido às baixas concentrações de NTK.

As concentrações de NTK nos afluentes do R1 e R2 ficaram em torno de 30 mg/L, valores baixos se comparados aos valores encontrados por Wang *et al.* (2010), que obtiveram valores de NTK iguais a 3305 mg/L no afluente e 3456 mg/L no efluente, tratando esterco de vaca utilizado como suplemento nutricional para o cultivo de microalgas verdes *Chlorella* sp. Zamolla *et al.* (2011), que realizaram ensaios de biodegradabilidade anaeróbia das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricorutum*, sob condições mesofílicas e termofílicas, apresentaram as características dessas microalgas, obtendo valores de 330 ± 136 mg/L e 594 ± 220 mg/L de NTK, respectivamente, valores bem maiores se comparados aos obtidos no presente trabalho.

Figura 26 - Gráficos de concentração de NTK no afluente e efluente do R1 e R2 respectivamente



Fonte: Autora

Nota: A_R1 – afluente do reator 1; E_R1 – efluente do reator 1; A_R2 – afluente do reator 2; E_R2 – efluente do reator 2

5.3.4 Alcalinidade e AGV

Os parâmetros alcalinidade e AGV foram avaliados durante o experimento, sempre uma vez por semana, visando observar a estabilidade dos reatores quanto à produção de AGV e a alcalinidade necessária para manutenção de condições favoráveis ao seu funcionamento. Os valores médios de alcalinidade e AGV obtidos durante as diversas fases estão dispostos na Tabela 20, bem como a relação AGV/Alc, parâmetro indicador de estabilidade nos reatores anaeróbios.

Tabela 20 - Valores médios de alcalinidade e AGV e relação AGV/ALC

REATOR	FASE	ALCALINIDADE TOTAL	AGV	AGV/ALC
1	1	1204	81	0,07
	2	199	66	0,33
	3	149	134	0,90
	4	282	82	0,29
REATOR	FASE	ALCALINIDADE TOTAL	AGV	AGV/ALC
2	1	1297	110	0,08
	2	233	57	0,24
	3	204	50	0,24
	4	344	41	0,12

Fonte: Autora

Nota: AGV – ácidos graxos voláteis; ALC – alcalinidade; AGV/ALC – relação AGV/alcalinidade.

A partir da análise dos dados elencados na Tabela 20, observa-se que a relação AGV/ALC, que é um indicador de estabilidade em reatores anaeróbios, apresentou para o R2 valores abaixo de 0,3 para todas as fases, indicando boa estabilidade nas diversas fases, porém para o R1, a fase 2 ficou com AGV/ALC igual a 0,33 e na fase 4 essa relação foi igual a 0,90, indicando que a conversão dos AGV a metano não se dava na mesma proporção em que esses ácidos eram produzidos, e conseqüentemente ocorreu o acúmulo desses ácidos graxos voláteis, elevando a relação

AGV/ALC (AHRING *et al.*, 1995; WANG *et al.* 2001). Esses valores acima dos indicados foram observados no R1, ou seja, o reator utilizando microalgas brutas, o que implica concluir que o efeito do pré-tratamento se mostrou positivo também na estabilidade do R2 em relação à produção e consumo de AGV pelos micro-organismos na produção de metano.

5.3.5 Sólidos suspensos totais e voláteis.

Os sólidos suspensos totais e os sólidos suspensos voláteis foram monitorados em ambos os reatores, uma vez por semana, durante o experimento. Na avaliação dos resultados obtidos, é possível observar que, com o passar do tempo, o efluente apresentava cada vez mais sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis. A Tabela 21 mostra um resumo das concentrações de entrada e saída dos SST e SSV para ambos os reatores.

Em alguns pontos analisados, é possível observar que, tanto para os SST como para os SSV, em ambos os reatores, os resultados para o efluente se apresentaram maiores que para o afluente, indicando que não havia remoção desses sólidos suspensos em alguns momentos, ocorrendo exatamente o contrário, ou seja, além da não remoção dos sólidos suspensos de entrada, houve saída de uma quantidade maior de sólidos suspensos. Esse efeito pode ser explicado pelo que foi exposto por Rajeshwari *et al.* (2000), o qual citou que caso haja falta de nutrientes para a biomassa microbiana, o lodo torna-se mais floculento (devido a morte celular) e conseqüentemente menos denso, causando arraste de sólidos para fora do reator, o que pode explicar a quantidade de sólidos suspensos no efluente se apresentar maior que a quantidade no afluente, visto que os nutrientes presentes eram apenas os fornecidos pelas microalgas, não sendo talvez suficientes para manter a biomassa microbiana mais granulada.

Os valores de entrada e saída de SSV e SST para ambos os reatores eram bastante variáveis, devido à utilização de afluente real, o que justifica a grande dispersão observada nos desvios padrões. Os valores foram expostos apenas para fins de

visualização, não fornecendo qualquer informação precisa de eficiência ou efeito dos parâmetros avaliados no experimento.

Tabela 21 - Valores de SST e SSV obtidos para o afluente e efluente em ambos os reatores durante a fase experimental

REATOR	FASE	SSTaf	SSTef	SSVaf	SSVef
1	1	257	200	229	200
		38	25	38	25
		40	20	40	20
	Média	112 ± 126	82 ± 103	102 ± 110	82 ± 102
	2	90	44	90	33
		100	50	80	40
		30	10	30	10
		80	60	40	60
	Média	75 ± 31	41 ± 22	60 ± 29	36 ± 21
	3	113	105	110	96
		100	15	90	15
		101	123	101	114
	Média	105 ± 7	81 ± 58	100 ± 10	75 ± 53
	4	115	242	107	230
		145	441	118	306
		87	130	79	110
Média	116 ± 29	271 ± 158	101 ± 20	215 ± 99	
REATOR	FASE	SSTaf	SSTef	SSVaf	SSVef
2	1	37	40	37	40
		13	73	13	74
		100	20	40	0
	Média	50 ± 45	45 ± 27	30 ± 15	38 ± 37
	2	300	70	220	30
		50	120	40	90
		10	20	10	20
		90	10	90	10
	Média	113 ± 129	55 ± 51	90 ± 93	38 ± 36
	3	17	37	17	35
		229	64	207	55
		160	298	149	262
	Média	135 ± 108	133 ± 143	124 ± 97	117 ± 126
	4	75	67	70	66
		63	387	59	247
		93	233	83	204
Média	77 ± 15	229 ± 160	71 ± 12	172 ± 95	

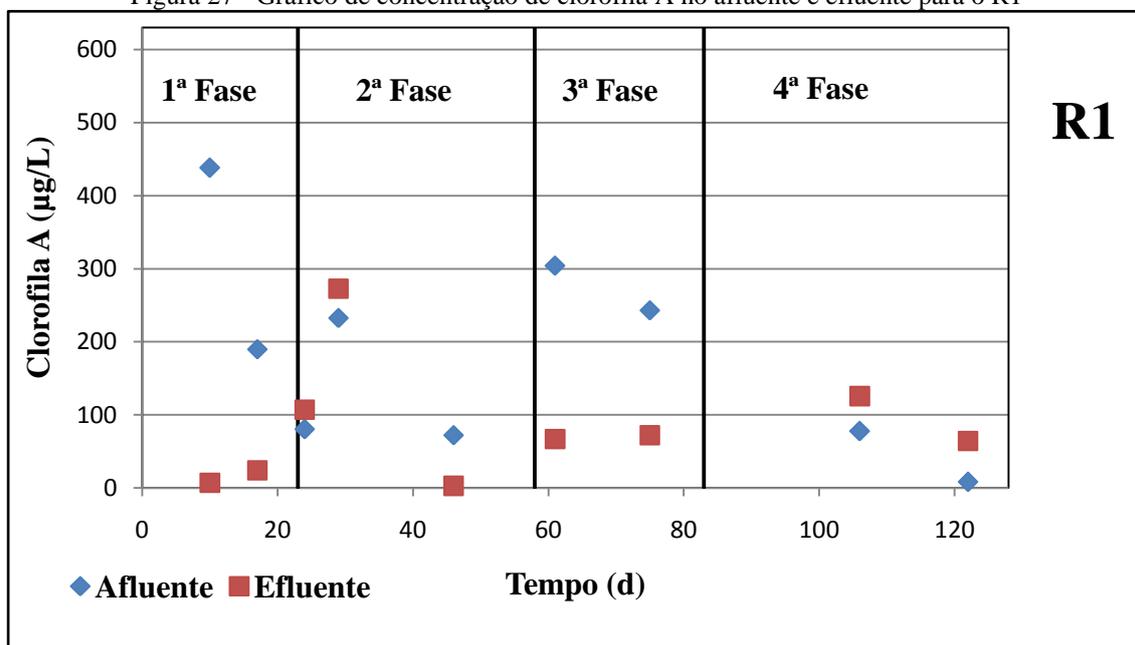
Fonte: Autora

Nota: **SSTaf** – sólidos suspensos totais no afluente; **SSTef** - sólidos suspensos totais no efluente; **SSVaf** – sólidos suspensos voláteis no afluente; **SSVef** – sólidos suspensos voláteis no efluente

5.3.6 Clorofila A

O parâmetro clorofila A foi avaliado durante toda a fase experimental, inicialmente uma vez por semana, em seguida optou-se por avaliar esse parâmetro uma vez a cada quinze dias. Essa mudança se deve à dificuldade na medição desse parâmetro por falta de metodologia para pequenas quantidades de amostra, visto que as quantidades que eram coletadas diariamente nos reatores não ultrapassavam 150 mL e a metodologia utilizada exigia um volume de 1 litro para o ensaio. De qualquer forma, foram realizadas as amostragens com 100 mL de amostra. De acordo com os resultados obtidos, no gráfico da Figura 27, para o R1, alguns valores de clorofila para o efluente apresentaram resultados maiores que para o afluente, especialmente nas fases 2 e 4. A remoção foi mais significativa somente nas fases 1 e 3.

Figura 27 - Gráfico de concentração de clorofila A no afluente e efluente para o R1

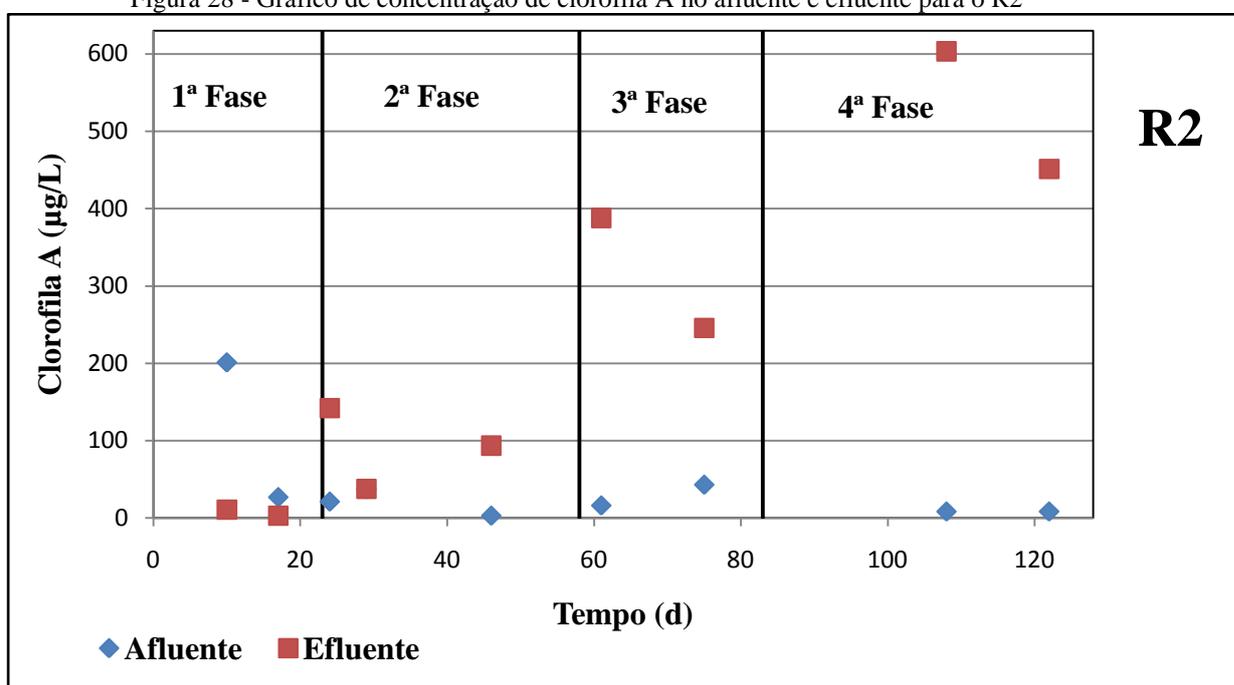


Fonte: Autora

No gráfico da Figura 28, para o R2, praticamente não ocorreu remoção em fase alguma, sendo observada remoção apenas nos dois ensaios realizados na fase 1. Durante as outras fases, os valores de clorofila A para o efluente foram cada vez maiores que para o afluente.

A literatura é bastante escassa para avaliação da remoção e degradação de clorofila A em digestão anaeróbia de microalgas, porém a partir dos resultados obtidos nesse trabalho, mesmo não sendo a metodologia a mais indicada para as quantidades ensaiadas, presume-se que a clorofila A que entrava no reator era agregada ao lodo de inóculo e posteriormente desprendida, saindo no efluente e provocando a elevação desses valores obtidos. Devido a isso, foram observadas maiores remoções na fase 1, em ambos os reatores.

Figura 28 - Gráfico de concentração de clorofila A no afluente e efluente para o R2



Fonte: Autora

Outro aspecto importante que se pode observar nas Figuras 27 e 28 é que o pré-tratamento aplicado à biomassa algal (efluente de lagoa) removeu grande parte da clorofila A afluente, pois a concentração média do afluente do R2 foi de 40 µg/L enquanto do R1 foi de 150 µg/L, indicando claramente uma remoção durante o tratamento térmico do afluente.

5.4 Concentração de metano no biogás

Durante a fase experimental, o biogás foi caracterizado quanto ao percentual de CH₄, CO₂ e ar, por cromatografia gasosa, porém não foi possível a quantificação da vazão de biogás produzida no reator devido a problemas operacionais relacionados aos medidores de gás mostrados na Figura 15 da seção 4.4 e devido à baixa produção de biogás.

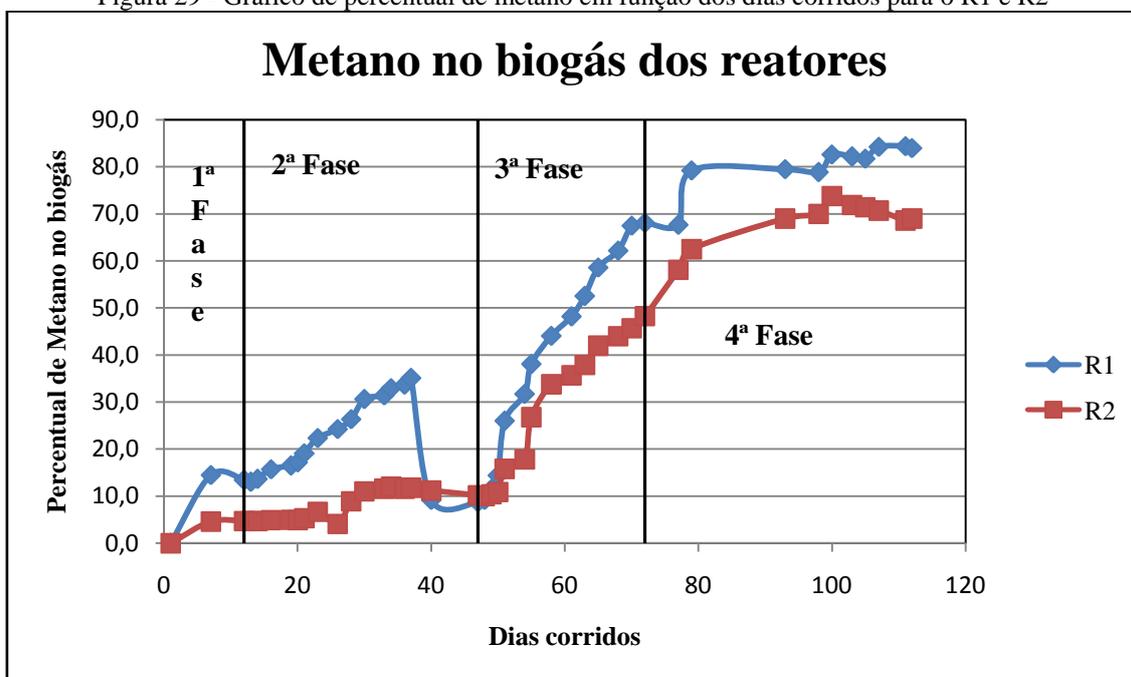
No gráfico da Figura 29, observa-se o percentual de metano produzido no biogás durante todo o experimento, para o R1 e o R2. Os resultados para o R1 apresentaram, durante toda a fase experimental, valores ligeiramente maiores de percentual de metano do que para o R2. Nesse caso não foi observado o exposto por Chen e Oswald (1998), que constataram uma melhora na eficiência da produção de metano em 33% na fermentação de algas tratadas (tratamento térmico durante 8 horas) em relação às algas não tratadas. No presente trabalho, o tratamento térmico aplicado foi de 30 minutos e em seguida, co-digeridas com o glicerol residual de biodiesel, podendo esses fatores representar influência nos resultados obtidos neste trabalho em relação ao citado anteriormente.

A produção de metano observada foi satisfatória e indicou que durante a digestão anaeróbia, houve equilíbrio estável, sendo a produção de biogás com altos percentuais de metano um fator que implica menos necessidade na purificação desse metano (PARK, LI, 2012).

Foram obtidos percentuais de metano no biogás produzido, de até 84% no R1 e de até 73% no R2, valores próximos à faixa de valores encontrada em alguns estudos (69 a 75%), independente da espécie e das condições de funcionamento (SIALVE *et al.*, 2009). Ambos os valores foram superiores aos percentuais encontrados por Henrard *et al.* (2011), que obtiveram percentual médio de 71,8% de metano no biogás, digerindo anaerobiamente a microalga *Spirulina* LEB-18 e aos percentuais encontrados por Park e Li (2012), que encontraram percentuais variando de 33 a 69%, na co-digestão de resíduo de biomassa algal e resíduos de óleos, graxas e gorduras. Esse percentual de metano no biogás é um indicativo de que as formas de inibição da

atividade metanogênica no consórcio microbiano eram baixas ou ausentes (PARK, LI, 2012).

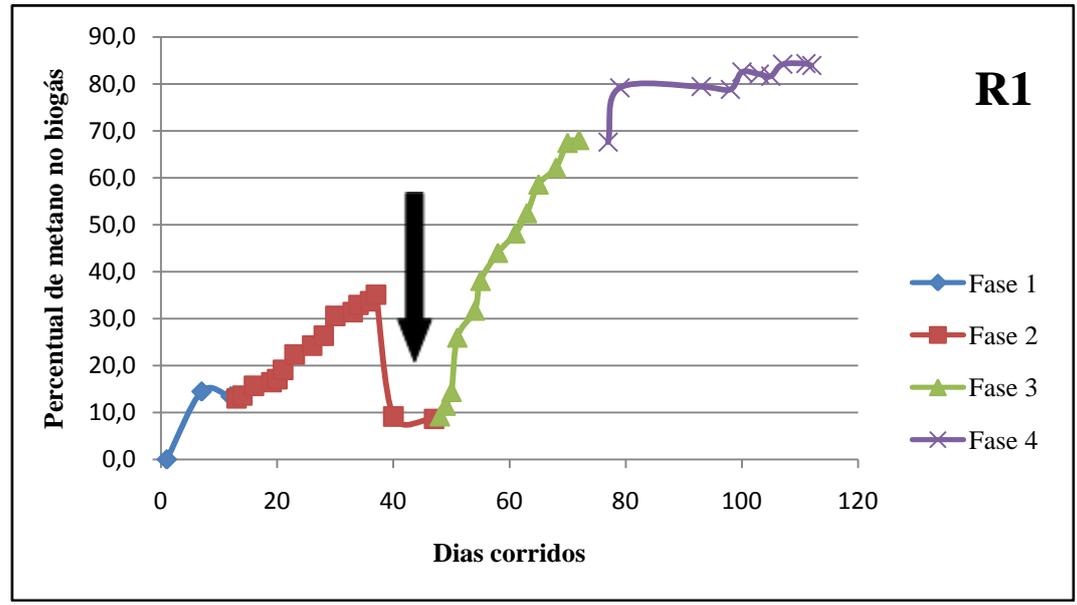
Figura 29 - Gráfico de percentual de metano em função dos dias corridos para o R1 e R2



Fonte: Autora

Nos gráficos das Figuras 30 e 31, estão os percentuais de metano no biogás produzido durante as fases 1, 2, 3 e 4, no R1 e R2. Quanto à avaliação da relação DQO/N, observa-se pelo gráfico que ocorreu uma maior taxa de produção de metano na fase 3. Na fase 4 houve uma diminuição na taxa de produção de metano; nas fases 1 e 2 a taxa de produção manteve-se numa faixa mais constante que para a fase 3.

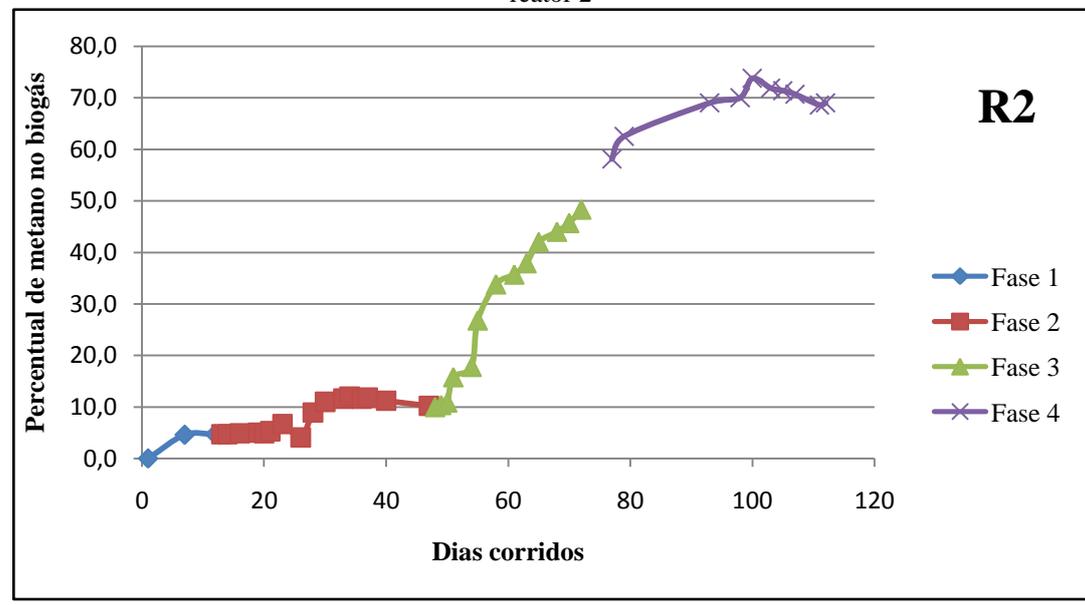
Figura 30 - Gráfico de percentual de metano em função dos dias em cada fase do experimento para o reator 1



Fonte: Autora

Nota: a seta no gráfico indica entrada de ar no reator 1, provocando a diminuição do percentual de metano

Figura 31 - Gráfico de percentual de metano em função dos dias em cada fase do experimento para o reator 2



Fonte: Autora

5.5 Influência do pré-tratamento na remoção de DQO

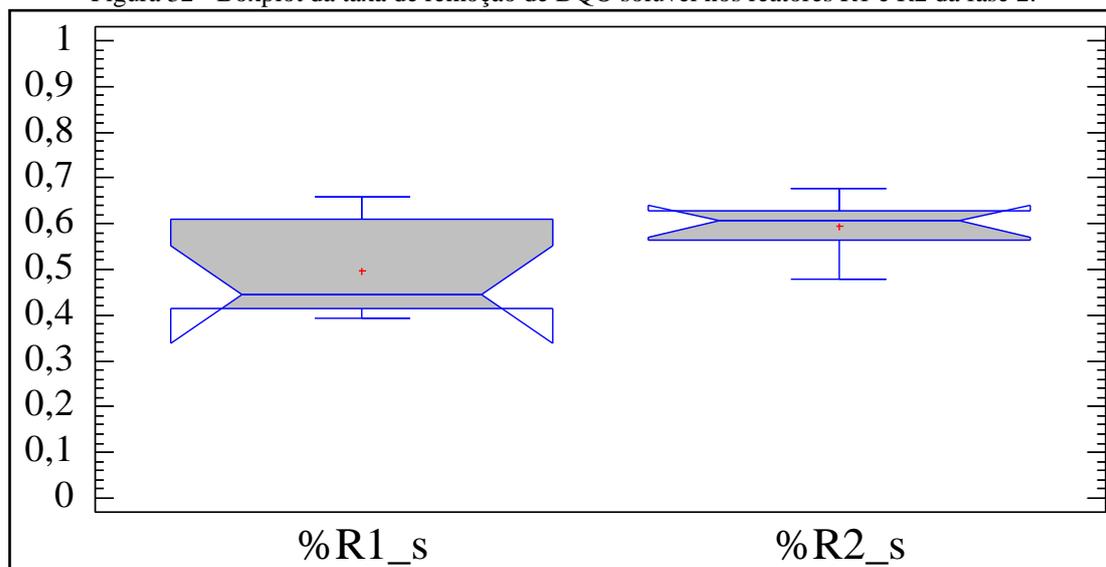
Para analisar a influência do pré-tratamento na remoção de DQO, foram comparadas as fases 2, 3 e 4 entre os reatores. Foi utilizada comparação de medianas com o teste W de Mann-Whitney, com as seguintes condições para todas as fases:

- Hipótese nula: mediana do R1 = mediana do R2
- Hipótese alternativa: mediana do R1 \neq mediana do R2
- Se p-valor for menor que 0,05, rejeita-se a hipótese nula em favor da hipótese alternativa.
- Intervalo de confiança de 95%

5.5.1 Fase 2

Como se pode observar na Figura 32 e pelo valor de p (0,083), não se rejeita a hipótese nula, ou seja, o pré-tratamento não interferiu na remoção de DQO solúvel, no entanto, pela Figura 32, se pode observar uma distribuição mais homogênea dos resultados do reator R2, pois a diferença entre o 1º e 3º quartis foi menor que no reator R1, podendo-se concluir que o reator alimentado com biomassa algal pré-tratada apresentou uma maior estabilidade de operação.

Figura 32 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel nos reatores R1 e R2 da fase 2.

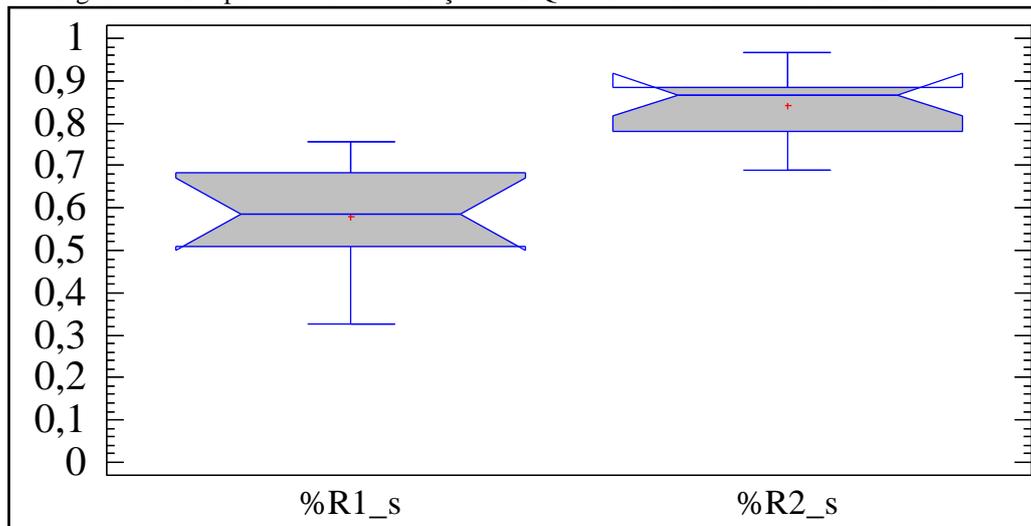


Fonte: Autora

5.5.1 Fase 3

Como se pode observar na Figura 33 e pelo valor de p ($4,4 \times 10^{-4}$), rejeita-se a hipótese nula, ou seja, o pré-tratamento melhorou a eficiência de remoção de DQO. Além disso, como descrito na fase anterior, se pode observar uma distribuição mais homogênea dos resultados do reator R2, pois a diferença entre o 1º e 3º quartis foi menor que no reator R1, podendo-se concluir que o reator alimentado com biomassa algal pré-tratada apresentou uma maior estabilidade de operação.

Figura 33 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel nos reatores R1 e R2 da fase 3.

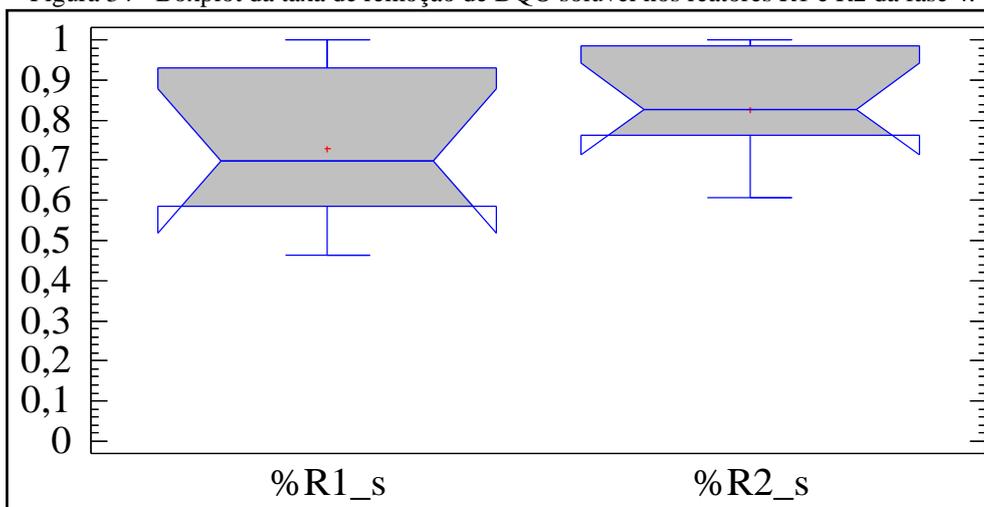


Fonte: Autora

5.5.1 Fase 4

Como se pode observar na Figura 34 e pelo valor de p (0,18), não se rejeita a hipótese nula, ou seja, o pré-tratamento não interferiu na remoção de DQO solúvel, no entanto, pela Figura 34, se pode observar uma distribuição mais homogênea dos resultados do reator R2, pois a diferença entre o 1º e 3º quartis foi menor que no reator R1, podendo-se concluir que o reator alimentado com biomassa algal pré-tratada apresentou uma maior estabilidade de operação.

Figura 34 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel nos reatores R1 e R2 da fase 4.



Fonte: Autora

5.6 Influência da relação DQO/N na remoção de DQO

Para analisar a influência da relação DQO/N na remoção de DQO, foram comparadas as fases 2, 3 e 4 de cada reator. Foi utilizada comparação de medianas com o teste Kruskal-Wallis, com as seguintes condições para todas as fases:

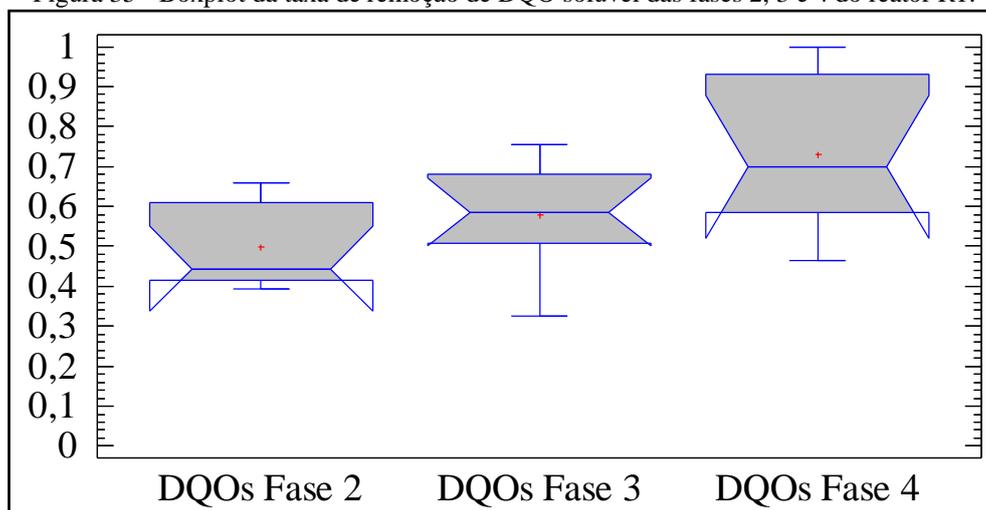
- Hipótese nula: mediana da fase 1 = mediana da fase 2 = mediana da fase 3
- Hipótese alternativa: mediana da fase 1 \neq mediana da fase 2 \neq mediana da fase 3
- Se p-valor for menor que 0,05, rejeita-se a hipótese nula em favor da hipótese alternativa.
- Intervalo de confiança de 95%

5.6.1 Reator R1

Como se pode observar na Figura 35 e pelo valor de p (0,034), rejeita-se a hipótese nula, ou seja, o aumento da relação DQO/N teve influência na taxa de remoção de matéria orgânica. Como se pode ver na Figura 35, não existe diferença significativa entre as fases 2 e 3 e entre as fases 3 e 4, no entanto, entre as fases 2 e 4, houve

diferença significativa. Portanto, a fase 4 apresentou os melhores resultados, em relação a remoção de DQO solúvel.

Figura 35 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel das fases 2, 3 e 4 do reator R1.

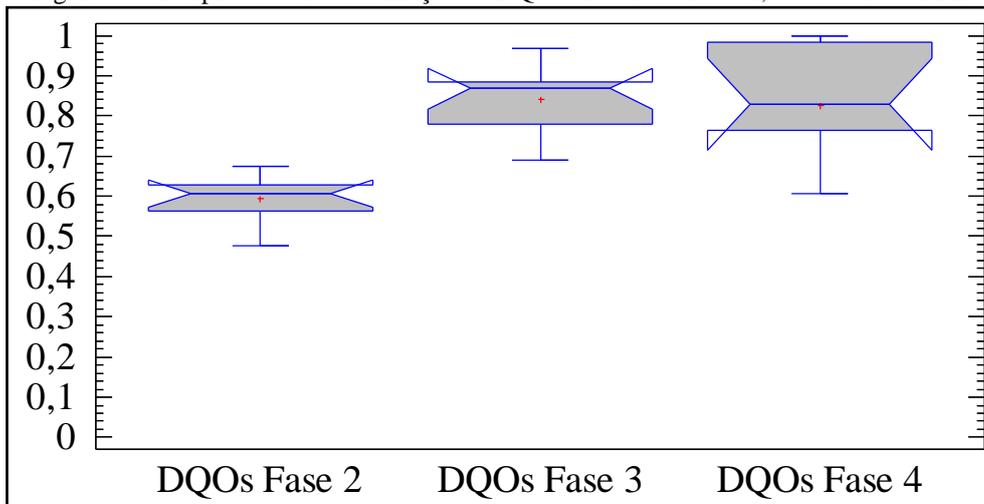


Fonte: Autora

5.6.1 Reator R2

Como se pode observar na Figura 36 e pelo valor de p ($9,36 \times 10^{-4}$), rejeita-se a hipótese nula, ou seja, o aumento da relação DQO/N teve influência na taxa de remoção de matéria orgânica. Como se pode ver na Figura 36, não existe diferença significativa entre as fases 3 e 4, no entanto, entre as fases 2 e 3, 3 e 4, houve diferença significativa. Portanto, como não houve influência do aumento da relação DQO/N entre as fases 3 e 4 e devido a maior estabilidade de operação do reator na fase 3, se pode concluir que a fase 3 apresentou os melhores resultados, em relação a remoção de DQO solúvel.

Figura 36 - Boxplot da taxa de remoção de DQO solúvel das fases 2, 3 e 4 do reator R2.



Fonte: Autora

6 CONCLUSÕES

O lodo utilizado nos ensaios de remoção de DQO apresentou atividade metanogênica específica (AME) na presença de glicose, com valor de 0,26 g DQO/g SSV.d. A carga máxima que pode ser aplicada ao lodo em estudo foi determinada utilizando o valor de AME obtido com a glicose, o qual apresentou uma carga de aproximadamente 9,6 g DQO/L.d, dado importante para a partida (*start-up*) dos reatores anaeróbios utilizados neste estudo.

Nas condições estudadas, o tipo de pré-tratamento influenciou significativamente a produção de metano, sendo os melhores resultados obtidos com tratamento térmico (autoclave) e 30 minutos de exposição. Baseado neste resultado, o pré-tratamento térmico por 30 minutos foi selecionado para ser aplicado ao reator UASB utilizado no experimento.

O efeito do pré-tratamento realizado nas microalgas mostrou-se influente na remoção de DQO solúvel e total, observando-se que as eficiências de remoções para o R2 apresentaram valores maiores, comparados ao R1, tanto para a fração total quanto para a fração solúvel.

Foi possível observar que a tendência de aumento de eficiência de remoção se deu com o tempo e com o aumento de cargas orgânicas, o que faz presumir que a biomassa se adaptava com o passar do tempo, apresentando um comportamento gradativo quanto às eficiências de remoção de DQO, podendo ser observado também que esse efeito teve forte influência no percentual de metano no biogás.

Os reatores foram operados sem adição de macro e micronutrientes, além da não adição de NaHCO_3 até o final da fase 3, obtendo-se remoções significativas de DQO (valores próximos a 60%).

As concentrações de amônia encontradas, que basicamente foram todas na forma ionizada, são consideradas relativamente baixas, provavelmente devido ao teor protéico ser baixo nas amostras utilizadas.

O pré-tratamento aplicado à biomassa algal (efluente de lagoa) removeu grande parte da clorofila afluente, pois a concentração média do afluente do R2 foi de

40 $\mu\text{g/L}$, enquanto do R1 foi de 150 $\mu\text{g/L}$, indicando claramente uma remoção durante o tratamento térmico do afluente.

Foram obtidos percentuais de metano no biogás produzido, de até 84% no R1 e de até 73% no R2.

O pré-tratamento térmico não interferiu na degradação de matéria orgânica nas fases 2 e 4, no entanto, apresentou diferença significativa para a fase 3, ou seja, o pré-tratamento térmico melhorou a remoção de DQO nesta fase.

O aumento da relação DQO/N teve influência na degradação de matéria orgânica para ambos os reatores.

Os melhores resultados encontrados foram:

- Biomassa algal (efluente de lagoa) com pré-tratamento térmico a 120°C e 1 kgf/cm^2 durante 30 minutos.
- Relação DQO/N de 40.

7 RECOMENDAÇÕES

- Avaliar a influência do pré-tratamento e da relação DQO/N na produção (vazão) de biogás.
- Avaliar a estabilidade do reator operando com cargas mais elevadas, visando aumento na produção de metano.
- Avaliar a utilização de outra fonte de biomassa algal como fonte de macro e micronutrientes.
- Estudar outros tipos de pré-tratamento para a biomassa algal (pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino, pré-tratamento hidrolítico).
- Avaliar o desempenho dos reatores com um longo período de operação.
- Estudar o aumento de escala do sistema proposto, visando uma aplicação real.
- Avaliar a robustez do sistema frente a problemas operacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABES. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. PROSAB- Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. Rio de Janeiro, 464 p. 1999.
- AHRING, B. K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 559-563, 1995.
- ALBUQUERQUE, V. F. **Uso de um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) na remoção de sulfato, dco, e das espécies metálicas Níquel (Ni^{2+}), Zinco (Zn^{2+}) e Cobre (Cu^{2+})**. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental). Universidade Federal do Ceará, CE, 2009.
- ANGELIDAKI, I; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, L.; GUWY, A.J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P; VAN LIER, J.B. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 53, p. 927 – 934, 2009.
- ANGELIDAKI, I. SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 3, p.117-129. 2004.
- APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 21^a ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M.L.F.; MONTEGGIA, L.O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p. 1-8, 2007.
- BARROS, A. R. M.; SANTOS, S. L.; PEIXOTO, F. S.; SILVA FILHO, H. A. Acompanhamento da partida de reator UASB através da atividade metanogênica

específica. **In: V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**, Maceió. V CONNEPI, 2010.

BENGTSSON, S. HALLQUIST, J. WERKER, A. WELANDER, T. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 492 – 499, 2008.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E. S.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 9-20. Jan/Jun - 2008.

BONI, L. A. B. **Tratamento da glicerina bruta e subprodutos obtidos da reação de transesterificação de sebo bovino utilizada para a produção de biodiesel. 2008.** Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia: Energia, Ambiente e Materiais). Universidade Luterana do Brasil, 2008.

BORJA, R.; SGNCHEZ, E.; WEILAND, P. Influence of Ammonia Concentration on Thermophilic Anaerobic Digestion of Cattle Manure in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. **Science**, v. 31, n. 5, p. 477-483, 1996.

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

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 170, n. 1-4, p. 315 – 331, 1997.

CARNEIRO, P. M. **Remoção de BTEX em biorreatores anaeróbios sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênicas.** 2012. 130p. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental). Universidade Federal do Ceará, CE, 2012.

CARNEIRO, T.G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, v. 1, n. 32, p. 36-41, 2008.

CAVALCANTI, A.L.A.; CAMPELO, J.A.; GAMA, T.C.C.L. Microalgas em lagoas de estabilização no semiárido pernambucano e suas implicações na saúde: Um estudo de caso em Petrolina – PE. **Enciclipédia Biosfera**, v. 6, n. 10, 2010.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Série Relatórios. **Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem.** 43p, São Paulo, 2009.

- CHAMY, R.; RAMOS, C. Factors in the determination of methanogenic potential of manure. **Bioresource Technology**, v. 102, n.17, p.7673-7677, 2011.
- CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; LAW, C. L.; HASSEL, D. G. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, V. 155, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- CHEN, P.H.; OSWALD, W.J. Thermochemical treatment for algal fermentation. **Environment International**, V. 24, n. 8, p. 889-897, 1998.
- CHEN, Y; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4044-64, 2008.
- CHERNICHARO, C. A. de L. **Reatores Anaeróbios**. 2^a ed. Belo Horizonte - MG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 380p. 1997.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3,p. 294–306, 2007.
- CHYNOWETH, D.P. Renewable biomethane from land and ocean energy crops and organic wastes. **HortScience**, v. 40, p. 283 – 286, 2005.
- CONTRIM, L. H. B. **ASBR aplicado ao tratamento de efluente do processo de produção de biodiesel**.2009. 171 p. Dissertação (Mestrado em processos químicos e bioquímicos). Centro Universitário do Instituto Mauá- São Caetano do Sul- SP, 2009.
- DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science Biotechnology**, v. 7, n. 2, p.1569-1705. 2008.
- DEMIREL B; YENIGU, O. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 77, p. 743 – 755, 2002.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELLA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959 – 1967, Nov./Dez. 2006.
- DOS SANTOS, A. B. Aplicação conjunta de tratamento anaeróbico termofílico por lodo granular e de mediadores redox na remoção de cor de águas residuárias têxteis. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p. 253-259, 2005.
- EHIMEN, E.A.; CONNAUGHTON, S.; SUN, Z.; CARRINGTON, C.G. Energy recovery from lipid extracted transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. **GCB Bioenergy**, v.1, n. 6, p. 371-381, Dezembro 2009.

ECKE, H.; LAGERKVIST, A. Anaerobic treatment of putrescible refuse (ATPR). Luleå: The Division of Waste Science & Technology of Luleå. University of Technology (LTU), 2000, p.47. Report 2000:01. Disponível em: <http://mie.esab.upc.es/ms/informacio/compostatge_digestio_anaerobia/digestio_anaerobia/anaerobic_digestion_LULEA.pdf>. Acesso em 23 janeiro. 2012.

ELSER, J.J.; FAGAN, W.F.; DENNO, R.F.; DOBBERFUHL, D.R.; FOLARIN, A.; HUBERTY, A.; INTERLANDIS, S.; KILHAM, S.S.; MCCAULEN, E.; SCHULZ, K.L.; SIEMANN, E.H.; STERNER, R.W. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. **Nature**, v. 408, p. 578 – 580, 2000.

FERNÁNDEZ, A.V.; VARGAS, G.; ALARCÓN, N.; VELASCO, A. Evaluation of marine algae as a source of biogás in a two-stage anaerobic reactor system. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 4, p. 338-344, 2008.

GOLUEKE, C.G.; OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Anaerobic digestion of algae. **Appl Microbiol**, v. 5, p. 47 – 55, 1957.

HARADA, H.; UEMURA, S.; MONOMOI, K. Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. **Water Research**, v. 28, n. 2, p. 355-367, 1994.

HENRARD, A.A.; ROSA, A.P.C.; ANDRADE, M.R.; MORAIS, M.G.; ZÍLIO, R.L.; COSTA, J.A.V. Produção de biogás a partir de biomassa microalgal. **III Congresso Brasileiro de Carvão Mineral**, 2011.

HUTŇAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODÍK, IGOR; ŠPALKOVÁ, V.; LAZOR, M. Possibilities of anaerobic treatment of crude glycerol from biodiesel production. In: MARKOS, J. (ed.). INTERNATIONAL CONFERENCE OF SLOVAK SOCIETY OF CHEMICAL ENGINEERING, 36, 2009. Tatranske. **Anais...**, Tatranské Matliare: Slovak Society of Chemical Engineering, p. 156-1 – 156-13, 2009.

JAWED, M.; TARE, V. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. **Water SA**, v. 25, n. 3, p. 1-6, 1999.

JOURDAN, J. P. Cultivez votre spiruline. Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline. 1996. Disponível em: <<http://www.antenna.ch/documents/manuelJourdan2061.pdf>>. Acesso em: 29/03/2012

LEITÃO, R.C.; VIANA, M.B.; PINTO, G.A.S.; FREITAS, A.V.; SANTAELLA, S.T. Produção de biogás a partir do glicerol oriundo do biodiesel. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 4p, 2011. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55346/1/COT11018.pdf>>. Acesso em: 05/04/2012.

- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos. RiMa, 606 p. 2006.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2^a Ed. Jaguariúna – SP. Embrapa Meio Ambiente, 2008.
- MORAND, P.; BRIAND, X. Anaerobic digestion of *Ulva* sp. 2. Study of *Ulva* degradation and methanisation of liquefaction juices. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 165 – 177, 1999.
- MOTA, S. **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2^a edição. Rio de Janeiro. ABES, 1995.
- NEENAN, B.; FEINBERG, D.; HILL, A.; MCLINTOSH, R.; TERRY, K. **Fuels from Microalgae: Technology Status, Potential and Research Requirements**. SERI/SP-231-2550, 172 p. Solar Energy Research Institute, Golden, CO. 1986.
- NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JORDÃO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 327-329, 2002.
- NIETO, Pedro P. Diez. **Desarrollo de equipos automatizados para La realización de ensayos anaeróbios**. 2006. 415p. Tese de doutorado (Doutorado em Engenharia Química). Centro de Ciências, Universidade de Valladolid, Valladolid, Espanha, 2006.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**. V. 20, p. 459-456, 2003.
- PARK, S. LI, Y. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 42 – 48, 2012.
- PEQUENO, M. A. G. **Avaliação do potencial de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa**. 2010. 66p. Dissertação (mestrado em química). Universidade Federal da Paraíba, PB, 2010.
- PEREIRA, M. A. A. de S. **Degradação de ácido oléico em filtro anaeróbio: efeito da adaptação do inóculo e da recirculação da biomassa**. 1998. 102p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). Universidade do Minho. 1998.
- PINTO, C. P. **Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável**. 1999. 162p. Dissertação (Mestrado em planejamento de sistemas energéticos). Universidade Estadual de Campinas, SP, 1999.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 135 – 156, 2000.

RAS, M.; LARDON, L.; BRUNO, S.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 200-206, 2011.

REICHERT, G. A. Aplicação da digestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos: uma revisão. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2005.

REIMANN, C.; FILZMOSE, P.; GARRET, R.; DUTTER, R. **Statistical data analysis explained: Applied environmental statistics with R**. Chichester, UK: Wiley. 343p. 2008.

RIBAS, M. M. F.; MORAES, E. M.; FORESTI, E. Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade a bicarbonato para monitoramento de reatores anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 240-246, 2007.

RIBEIRO, N. J. M. S. **Estudos dinâmicos do processo de digestão anaeróbia com vista ao desenvolvimento de um sistema inteligente de supervisão baseado em conhecimento**. 1999, 99p. Tese (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, 1999.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FLORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2008.

ROBRA, S. **Utilização da glicerina bruta em biodigestão anaeróbia: Aspectos tecnológicos, ambientais e ecológicos**. 2006. 120p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, 2006.

SANTOS, A.P.B.; PINTO, A.C. Biodiesel: uma alternativa de combustível limpo. **QNEsc**, v.31, n.1, p.58-62, 2009.

SANTOS, S.P.; CORREIA, M.L.A. Programa nacional de produção e uso do biodiesel e o desenvolvimento sustentável. **VII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**. Fortaleza, 2007.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 61, n. 2, p. 262-280. 1997.

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

SILES LÓPEZ, J.A.; SANTOS, M.A.M.; PÉREZ, A.F.C.; MARTÍN, A.M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource technology**, v. 100, n. 23, p. 5609-5615, 2009.

SILES, J. A.; MARTÍN, M. A.; CHICA, A. F.; MARTÍN, A. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6315 – 6321. 2010.

SILES, J.A.S.; SANTOS, M.A.S.; PÉREZ, A.F.C.; MARTIN, A.M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, 2009.

SILVA, F. J. A.; SILVA, S. A. Lagoas de estabilização no Ceará: prospecto e tendências. In: **20º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental**. ABES Rio, Anais em CD-Room. I-124, p. 633 – 639. 1999.

SILVA, W. R. **Estudo cinético do processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos vegetais**. 2009. 201p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB. 2009.

SILVEIRA, G. S. dos. **Estudo de co-digestão anaeróbia de lamas domésticas com o efluente da indústria da fermentação da levedura do pão da empresa Mauri Fermentos**. 2009. 119p. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia). Universidade Nova de Lisboa. Lisboa – Portugal. 2009.

SOUTO, T.F.; AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q.; CHERNICHARO, C.A.L. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. **Biodegradation**, v. 21, p. 411-424, 2010.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAM, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, Fevereiro 2006.

TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; JOUZANI, G.S.; SAFARNEJAD, M.; PAZOUKI, M. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 4, p. 1918-1927, 2011.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 10ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 726 p. 2008.

VAVILIN, V.A.; RYTOW, S. V.; LOKSHINA, L. Y. Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. **Bioresource Technology** **54**. P. 171-177. 1995.

VIANA, M. B. **Produção de biogas a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. 2011, 130 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento e Hidráulica). Universidade de São Carlos, São Carlos – SP, 2011.

VON SPERLING, M. **Princípios Básicos de Tratamento de Esgotos**. Belo Horizonte-MG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG, 1996.

VON SPERLING, M. **Lagoas de Estabilização**. Belo Horizonte – MG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG, 1986.

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; ZHU, J.; RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2623-2628, 2010.

WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001.

WELLINGER, A. Process design of agricultural digesters. Ettenhausen: **Nova Energie**, 1999. Disponível em:<http://homepage2.nifty.com/biogas/cnt/refdoc/whrefdoc/d14prdgn.pdf>. Acesso em: 05 de novembro de 2011.

YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic waste with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 362 – 367, 2008.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

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

ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource technology**, v. 102, p. 1149-1158, 2011.

ZAYED, G.; WINTER, J. Inhibition of methane production from whey by heavy metals – protective effect of sulfide. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54, p. 726 – 731, 2000.