



Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Escola de Química e Alimentos - EQA

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA CO-DIGESTÃO DE RESÍDUOS DA  
GERAÇÃO DE ENERGIA**

Pâmela Guder Goularte

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michele da Rosa Andrade Zimmermann de Souza

Rio Grande, RS

2014



Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Escola de Química e Alimentos - EQA

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA CO-DIGESTÃO DE RESÍDUOS DA  
GERAÇÃO DE ENERGIA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Engenharia e  
Ciência de Alimentos.

Pâmela Guder Goularte

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michele da Rosa Andrade Zimmermann de Souza

Rio Grande, RS

2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meus anjos da guarda Vó Tereza e Vô Afonso pela sabedoria e pelas oportunidades concedidas em minha vida.

Aos meus pais, Juarez e Lúcia, por me ensinarem a valorizar o saber, por terem me encaminhado na educação e por tudo que fizeram e continuam fazendo para meus sonhos se realizarem, obrigada.

À minha irmã Samara, minha “pequena”, simplesmente pela alegria, por todo o incentivo, amizade e amor, e por ser esta menina cheia de sonhos o que nos faz acreditar que o amanhã vale a pena, à minha irmã Cíntia, pela amizade.

Ao meu namorado Júnior, meu companheiro, meu amigo, meu amor, a minha segunda família Mara Lúcia, Darci, Rita, Raoni, Barbara meus pequenos Otavio e Lara, pelo apoio incondicional pela dedicação constante, pelo incentivo a cada dia e por sempre acreditarem em meu potencial até mesmo nos momentos que nem eu mesmo acreditava obrigada.

As minhas grandes amigas Ana Cláudia, Denise Perius, Diovana, Joice, Luiza, Roberta e ao grande Gabriel, por estarem presentes em tantas etapas dessa caminhada, pelo carinho, alegria que só elas transmitem, pelo incentivo, disponibilizando horas do seu precioso tempo para me auxiliarem, dividindo comigo seus conhecimentos, obrigada pela paciência!!!

Aos meus orientadores Jorge e Michele pela orientação, compreensão, dedicação e paciência em doar diversas formas de aprendizado.

As iniciantes científicas Daia e Andressa, por toda ajuda concedida, pela amizade e dedicação.

A todos os colegas do LEB, pela amizade, as minhas colegas Juliana Latores e Juliana Guerra, pelo auxílio ao ligar, desligar a mufla, também pela amizade e alegria que transmitem, obrigada meninas.

Juliana Moura (Refinaria Riograndense), pelas análises cromatográficas, a professora Mônica Wellner, pelas análises elementares.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 Geral.....	3
2.2 Específicos.....	3
3 JUSTIFICATIVA.....	4
4 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO.....	7
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
5.1 Glicerol.....	9
5.2 Biomassa de <i>Spirulina</i> .....	10
5.3 Produção de <i>Spirulina</i> através da fixação de CO <sub>2</sub> industrial.....	12
5.4 Fundamentos Digestão Anaeróbia.....	12
5.4.1 Hidrólise.....	13
5.4.2 Acidogênese.....	13
5.4.3 Acetogênese.....	14
5.4.4 Metanogênese.....	14
5.5 Bioquímica da digestão anaeróbia de glicerol.....	15
5.6 Co-digestão.....	18
5.7 Biogás.....	19
5.8 Relação C/N.....	20
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
6.1 Inóculo.....	21
6.2 Substrato.....	21
6.3 Biorreatores e Condições Operacionais.....	23
6.4 Determinações Analíticas.....	24
6.5 Respostas avaliadas.....	25

6.6 Análise estatística.....	25
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
8 CONCLUSÃO .....	36
9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	37
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
11 ANEXOS.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição centesimal da <i>Spirulina</i> .....	11
Tabela 2 Produção de metano a partir da digestão anaeróbia de diversos substratos .....	15
Tabela 3 Comparativo energético do biogás com outros combustíveis .....	20
Tabela 4 Composição da alimentação de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e glicerol e razão C/N obtida para o primeiro grupo de experimento.....	22
Tabela 5 Composição da alimentação de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e glicerol e razão C/N obtida para o segundo grupo de experimentos.....	22
Tabela 6 Caracterização do glicerol bruto.....	23
Tabela 7 Composição centesimal da biomassa de <i>Spirulina</i> utilizada para produção de biogás.....	23
Tabela 8 Análise elementar da biomassa de <i>Spirulina</i> e glicerol.....	23
Tabela 9 Produção específica de biogás, decomposição da fração orgânica da alimentação e conversão de sólidos voláteis em biometano ( $Y_{CH_4/SV}$ ).....	28
Tabela 10 Produção específica de biogás, decomposição da fração orgânica da alimentação e conversão de sólidos voláteis em biometano ( $Y_{CH_4/SV}$ ) encontrados na literatura.....	29
Tabela 11 pH, alcalinidade e nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>4</sub> ) nos diferentes ensaios.....	31
Tabela 12 Formas e conversões do carbono na produção de biometano a partir da biomassa de <i>Spirulina</i> e glicerol.....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura do glicerol .....	9
Figura 2 Vista microscópica de uma <i>Spirulina</i> . .....	10
Figura 3 Esquema simplificado da digestão anaeróbia da matéria orgânica para obtenção de metano.....	13
Figura 4 Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples.....	17
Figura 5 Aparato experimental para a produção de biogás a partir da co-digestão anaeróbia com <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e glicerol bruto.....	24
Figura 6 Produção específica de biogás (P <sub>E</sub> ) nos ensaios.....	27
Figura 7 Alcalinidade nos ensaios.....	32
Figura 8 Concentração de nitrogênio amoniacal nos ensaios.....	33
Figura 9 “Sample bag” utilizada para coleta do gás.....	51
Figura 10 Reatores anaeróbios de 2 L utilizados nos ensaios.....	51
Figura 11 Sólidos Totais nos ensaios com alimentação de: E1 (10Sp), E2 (10Sp+5G), E3 (5Sp+5G), E4 (1Sp+5G).....	52
Figura 12 Sólidos totais nos ensaios com alimentação de: E5 (10Sp+5G), E6 (15Sp+5G) e E7 (5G).....	52
Figura 13 Sólidos voláteis nos ensaios com alimentação de: E1 (10Sp), E2 (10Sp+5G), E3 (5Sp+5G) e E4 (1Sp+5G).....	53
Figura 14 Sólidos voláteis nos ensaios com alimentação de: E5 (10Sp+5G), E6 (15Sp +5G) e E7(5G).....	53

## NOMENCLATURA

% v/v	Concentração percentual em volume
AOAC	Association Of Analytical Communities
APHA	American Public Health Association
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão (273,15 K; 101.325 Pa)
C/N	Razão carbono/nitrogênio
E1(10Sp)	Ensaio com alimentação de 10 g.L <sup>-1</sup> de biomassa
E2(10Sp +5G)	Ensaio com alimentação de 10 g.L <sup>-1</sup> de biomassa e 5 g.L <sup>-1</sup> de glicerol
E3(5Sp +5G)	Ensaio com alimentação de 5 g.L <sup>-1</sup> de biomassa e 5 g.L <sup>-1</sup> de glicerol
E4(1Sp +5G)	Ensaio com alimentação de 1 g.L <sup>-1</sup> de biomassa e 5 g.L <sup>-1</sup> de glicerol
E5(10Sp +10G)	Ensaio com alimentação de 10 g.L <sup>-1</sup> de biomassa e 10 g.L <sup>-1</sup> de glicerol
E6(15Sp +5G)	Ensaio com alimentação de 15 g.L <sup>-1</sup> de biomassa e 5 g.L <sup>-1</sup> de glicerol
E7(5G)	Ensaio com alimentação de 5 g.L <sup>-1</sup> de glicerol
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
SV	Sólidos Voláteis (g.L <sup>-1</sup> )
ST	Sólidos Totais (g.L <sup>-1</sup> )
$Y_{C\ CH_4/C\ Alim}$	Conversão do carbono da alimentação em metano (g.g <sup>-1</sup> )
$Y_{C\ CO_2/C\ Alim}$	Conversão do carbono da alimentação em dióxido de carbono (g.g <sup>-1</sup> )
$Y_{CH_4/Alim}$	Conversão da alimentação em metano (g.g <sup>-1</sup> )

## RESUMO

Aplicações de microalgas tem tornado esses micro-organismos importantes em pesquisas com fins tanto comerciais como energéticos. A biofixação de CO<sub>2</sub> por microalgas é vista como uma forma economicamente viável e ambientalmente sustentável para mitigar as emissões de CO<sub>2</sub> e geração de biomassa para obtenção de bioprodutos de alto valor agregado como os biocombustíveis. Na digestão anaeróbia da biomassa de microalgas a adição de um co-substrato rico em carbono pode facilitar o processo de produção de biogás. O glicerol possui alta concentração de carbono orgânico e é solúvel em água. Neste sentido, a combinação de ambos os substratos pode solucionar um dos principais problemas para o processo de digestão, que reside no equilíbrio da razão (C/N). Co-digestão anaeróbia consiste na digestão anaeróbia de uma mistura de dois ou mais substratos com composições complementares. O objetivo do estudo foi avaliar a geração de biogás através da co-digestão anaeróbia de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol bruto. Para a realização do estudo foram construídos e operados sete biorreatores com volume útil de 1,5 L, alimentados com 5, 6, 10, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup> da mistura de biomassa de *Spirulina* e glicerol. A adição de diferentes quantidades de glicerol (5 e 10 g.L<sup>-1</sup>) foi utilizada como um suplemento na digestão anaeróbia em sistema de batelada. A razão C/N variou de 3,3×10<sup>3</sup> a 23,7. Os ensaios foram realizados a 35 °C, em reatores equipados com sistema de coleta de gás, alimentação e retirada do efluente líquido, operados em batelada sequencial. O efluente líquido dos reatores foi analisado quanto ao pH, nitrogênio amoniacal e alcalinidade. O volume de biogás produzido diariamente foi medido em gasômetro de frasco invertido. Em todos os ensaios, os valores médios de pH variaram de 7,0 a 7,3 e nitrogênio amoniacal de 62,02 a 1100,99 mg.L<sup>-1</sup>. A alcalinidade do efluente variou entre 1133,37 e 3578,98 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. Em todos os ensaios com adição de glicerol houve incremento na produção específica de biogás (0,16 – 0,24 d<sup>-1</sup>) quando comparado ao ensaio em que somente biomassa microalgal era alimentada no processo (0,03 L.d<sup>-1</sup>), demonstrando ser esta uma alternativa interessante para a produção de biocombustível e concomitante agregação de valor ao glicerol residual da produção de biodiesel.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia, Glicerol, Metano, *Spirulina*

## ABSTRACT

Applications of microalgae have made these important micro-organisms in studies with both commercial and energy. The biofixation of CO<sub>2</sub> by microalgae is seen as an economically viable and environmentally sustainable way to mitigate CO<sub>2</sub> emissions and generation of biomass to obtain high value-added bioproducts like biofuels. In anaerobic digestion of biomass of microalgae rich adding a co-substrate carbon can facilitate the process of biogas production. Glycerol has a high concentration of organic carbon and is soluble in water. Accordingly, the combination of both substrates can solve major problems for the digestion process, which resides in balancing the ratio (C/N). Anaerobic co-digestion in the anaerobic digestion is a mixture of two or more substrates having complementary characteristics. The aim of the study was to evaluate the generation of biogas through anaerobic co-digestion of biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 and crude glycerol. For the study were built and operated seven bioreactors with working volume of 1.5 L, fed with 5, 6, 10, 15 and 20 g.L<sup>-1</sup> mixed biomass of *Spirulina* and glycerol. The addition of different amounts of glycerol (5 and 10 g.L<sup>-1</sup>) was used as a supplement in anaerobic digestion in a batch system. The C/N ratio varied from 3.3 to 20 Assays were performed at 35°C in a reactor equipped with gas collection, removal and feeding the liquid effluent system and operated in sequential batch. The reactor effluent was analyzed for pH, ammonia nitrogen and alkalinity. The volume of biogas produced was measured daily in gasholder inverted bottle. In all trials, the mean pH values ranged from 7.0 to 7.3 and ammonia nitrogen from 62.02 to 1100.99 mg.L<sup>-1</sup>. The alkalinity of the effluent was between 1133.37 and 3578.98 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. In all tests with the addition of glycerol there was an increase in the specific biogas production (0.16 to 0.24 L.d<sup>-1</sup>) when compared to the test when only microalgal biomass was fed into the process (0.03 d.L<sup>-1</sup>), demonstrating that this is an interesting alternative for the production of biofuel and concomitant adding value to the residual glycerol from biodiesel production.

Keywords: Anaerobic digestion, Glycerol, Methane, *Spirulina*



## 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade o interesse pelas energias renováveis vem crescendo a cada dia, pois elas são o caminho para a redução da dependência excessiva dos combustíveis fósseis, além de ser a solução mais segura para a diminuição das emissões dos gases do efeito estufa e para melhorar o abastecimento energético (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

A biomassa da cianobactéria *Spirulina* é utilizada como alimento desde a antiguidade (TOMASELLI, 1997) e atualmente é pesquisada como fonte de bioprodutos. Com o recente desenvolvimento de tecnologias para utilização de microalgas no sequestro de carbono (RADMANN et al., 2011) e produção de biogás (EL-MASHAD, HAMED, 2013; SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009), esses micro-organismos vêm ganhando projeção no contexto da mitigação do aquecimento global e no contexto energético.

A produção de microalgas tem se mostrado eficiente por sua rápida conversão de energia solar em biomassa explorável. Acima de tudo, as microalgas têm vantagens em relação às plantas superiores devido a maiores taxas de crescimento e a possibilidade de cultivo em áreas de terras não aráveis ou em lagos ou no oceano, atenuando, portanto, a competição por alimentação humana e animal (RITTMANN, 2008; STEPHENS et al., 2010).

Uma abordagem promissora, portanto, parece ser a utilização de microalgas para a fermentação anaeróbia para produção de biogás. Pesquisa sobre fermentação anaeróbia da biomassa de algas remonta há mais de 50 anos atrás (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957). Desde então um grande número de projetos de investigação foram efetuados. Os esforços de pesquisa iniciais atingiram o pico no final dos anos 1970 e 1980 como consequência da crise do petróleo. Recentemente, a identificação de cepas de microalgas com características promissoras (EROGLU, MELIS, 2010), o progresso no cultivo de microalgas (POSTEN, 2009) e técnicas de colheita (BRENNAN, OWENDE, 2010), bem como o potencial de algumas cepas de produzir co-produtos (SPOLAORE et al., 2006) tem despertado o interesse de usar esses organismos para a geração de biogás. Na digestão anaeróbia de biomassa de microalgas, que geralmente contém nitrogênio orgânico que está principalmente sob a forma de proteínas, podendo alcançar 74% da composição química da célula (COHEN, 1997), a adição de um co-substrato rico em carbono pode facilitar o processo de produção de biogás (YEN e BRUNE, 2007).

Co-digestão anaeróbia consiste na digestão anaeróbia de uma mistura de substratos com características diferentes, sendo uma maneira de diluir substâncias tóxicas

presentes em algum dos substratos, fornecer nutrientes que estão em falta em um substrato, melhorar efeitos sinérgicos sobre micro-organismos e aumentar a produção de biogás (MATA-ALVAREZ et al., 2011).

O glicerol oriundo da produção de biodiesel é um material líquido altamente poluente. Na sua constituição, além do próprio glicerol, encontram-se outras substâncias (óleos, ácidos graxos de cadeia longa, metanol, sais e outros) que, se dispostas no meio ambiente sem tratamento adequado, podem causar problemas de intoxicação, formação de espumas, mau cheiro e variações nas características naturais de um determinado ecossistema (VIANA, 2011). Com tudo isto, é necessário encontrar usos alternativos para o glicerol.

O glicerol resultante do processo de produção do biodiesel constitui um subproduto passível de aproveitamento para a produção de biogás, devido ao seu alto teor de carbono facilmente degradável (AMON et al., 2006), e assimilável por bactérias e leveduras sob condições anaeróbias. Uma alternativa para o uso do glicerol é a utilização como complemento na produção de biogás, pois conforme Robra et al. (2010), este apresenta o carbono necessário para a realização dos processos anaeróbios microbiológicos, mas precisa de um substrato rico em nitrogênio, para a geração de biogás. De acordo com Amon et al. (2004) o glicerol tem potencial para melhorar o desempenho da geração de biogás, uma vez que é constituído por mais de 20% de metanol, tornando-se um meio de cultura alternativo para certas bactérias metanogênicas. Estas vantagens tornam o glicerol um co-substrato em potencial para o processo de digestão anaeróbia.

O objetivo principal deste trabalho foi produzir biogás através da co-digestão anaeróbia utilizando como substratos biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol bruto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Produzir biogás através da co-digestão anaeróbia de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol bruto.

### 2.2 Específicos

- Caracterizar o processo e o produto formado na co-digestão anaeróbia de biomassa microalgal e glicerol;
- Determinar o efeito da razão entre concentração de carbono e nitrogênio (C/N) no processo e na produção do biogás produzido;
- Avaliar a variação de volume de biogás e metano gerado ao adicionar diferentes proporções de glicerol e *Spirulina* sp. LEB 18.

### 3 JUSTIFICATIVA

A adoção de fontes de energia alternativas e o uso de combustíveis fósseis de modo mais eficiente são algumas das formas de se reduzir a emissão de CO<sub>2</sub>. Nesse sentido, buscam-se novas alternativas para mitigar tais emissões e dar maior sustentabilidade à matriz energética (LARSEN, 2009).

A atividade industrial e a geração de energia termelétrica lançam cerca de 20 bilhões de toneladas de CO<sub>2</sub> na atmosfera anualmente. Parte é fixada por vegetais, principalmente árvores, outra parte pelas microalgas nos oceanos e o restante acumulado na atmosfera (TAKAHASHI, 2004). A emissão de dióxido de carbono no mundo atingiu novo recorde em 2011, com aumento de 2,5% em relação a 2010, segundo o Instituto de Energia Renovável da Alemanha (IWR, 2013). A produção mundial de dióxido de carbono em 2011 foi de aproximadamente 34 bilhões de toneladas, tendo um acréscimo de 834 milhões em relação ao ano anterior. A utilização de energias renováveis é apontada como principal solução para este problema e os investimentos neste tipo de energia foi de 543,90 milhões de euros (BRASIL, 2013).

Os processos biológicos tornaram-se uma alternativa interessante no combate à poluição e na geração de novos produtos, uma vez que esses processos utilizam-se do metabolismo microbiano para degradar e remover poluentes (GADD, 2008), bem como para transformar matérias primas gerando produtos menos nocivos ao meio ambiente. Nesses processos, existem micro-organismos atuantes, como algas e microalgas de diversas espécies (SARAVANAN et al., 2009), as quais tem sido utilizadas em estudos de tratamento de efluentes e biossorção de metais tóxicos (MEZZOMO et al., 2010; DAL MAGRO; HEMKEMEIER; COLLA, 2011), biofixação de CO<sub>2</sub> (MORAIS, COSTA, 2007) e produção de biocombustíveis (XU, MI, 2011).

Microalgas têm sido utilizadas na fixação de dióxido de carbono de usinas termelétricas (MORAIS, COSTA, 2011), provando ser um método eficiente e econômico, principalmente devido à capacidade fotossintética desses micro-organismos de usar o CO<sub>2</sub> como fonte de nutrientes para o seu crescimento (MORAIS, COSTA, 2007). A biofixação de CO<sub>2</sub> por microalgas é vista como uma forma economicamente viável e ambientalmente sustentável para mitigar as emissões de CO<sub>2</sub> e geração de biomassa para obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (JIANG et al., 2013). São necessários pelo menos 1,83 ton de CO<sub>2</sub> para a obtenção de 1,0 ton de biomassa microalgal (HO et al., 2010). Dessa forma,

com a grande quantidade de biomassa gerada, é vantajosa sua aplicação na produção de biogás.

Comparadas aos vegetais superiores, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética e podem ser cultivadas em meio salino (OLGUÍN et al., 2001). Além disso, as microalgas apresentam elevadas produtividades em biomassa, o que representa menor utilização de área para o cultivo, a região de cultivo pode ser desértica e o solo pode estar degradado, já que o mesmo é somente utilizado como suporte para o sistema de cultivo; a produção da biomassa é contínua e não segue regime de safras; o meio de cultivo pode ser reaproveitado e como fontes de carbono podem ser utilizados o CO<sub>2</sub> residual do processo (KAO et al., 2012; CONVERTI et al., 2009; BENEMANN, 1997) e fontes orgânicas residuais (ANDRADE, COSTA, 2008)

Migliore et al. (2012) afirmam que a metanização é o método mais estudado e utilizado para converter a biomassa de algas em energia útil. A quantidade e a composição do biogás produzido dependem da fonte de substrato, das condições ambientais, bem como da natureza do inóculo e das condições de fermentação (BRIAND e MORAND, 1997).

O glicerol é um subproduto da reação de transesterificação da produção de biodiesel. Estima-se que por cada 9 kg de biodiesel produzido, cerca de 1 kg de glicerol bruto é formado (DASARI et al., 2005). O aumento na produção de biodiesel tem criado um excedente de glicerol, que resultou na diminuição de seu preço (YAZDANI, GONZALEZ, 2007). A produção de glicerol proveniente do processamento do biodiesel é vendida, principalmente para indústria química. No entanto, a oferta de glicerol está se tornando bem maior que a demanda (SILES LÓPEZ et al., 2009), além de ter um elevado teor de impurezas, em torno de 20%, que afeta e encarece seu processamento industrial. Dentro deste cenário, os esforços de investigação para desenvolver utilizações para o glicerol bruto são feitas de forma a tornar o custo da produção de biodiesel sustentável, a longo prazo. Estudo realizado por Viana (2011) demonstrou a viabilidade da utilização do glicerol como substrato para produção de biogás e energia, e concluiu que o biogás produzido em um sistema anaeróbio digerindo glicerol pode ser utilizado para a geração de energia térmica ou elétrica.

Glicerol é caracterizado por possuir alto teor de carbono degradável podendo favorecer o processo de co-digestão, e, portanto, viabilizando formas alternativas de utilização que podem proporcionar sustentabilidade econômica e ambiental da produção do biodiesel (VIANA, 2011).

Amon et al. (2006) estudaram a digestão anaeróbia de uma mistura de dejetos de suínos com adição de 6% de glicerina que resultou em um aumento da produção de metano de aproximadamente 19%. A mistura de diferentes substratos é uma estratégia para melhorar o desempenho de um reator, com conseqüente aumento de produção de biogás (MATA-ALVAREZ; MACÉ; LLABRÉS, 2000).

A combinação de dois ou mais substratos cria um efeito sinérgico ao reduzir o desequilíbrio preexistente de nutrientes e, por sua vez, atenuando a inibição que, de outro modo, pode ocorrer durante a digestão do substrato individual. Na biomassa de *Spirulina*, nitrogênio orgânico está principalmente sob a forma de proteínas, que podem alcançar 74 % da composição química da célula (COHEN, 1997). O maior inconveniente na produção de biometano a partir de substratos de alto valor proteico é a concentração de nitrogênio amoniacal gerada na decomposição anaeróbia dessas biomoléculas (RAMSAY, PULLAMMANAPPALLIL, 2001). Dessa forma, a microalga *Spirulina* pode ser utilizada como co-substrato ao processo de digestão anaeróbia, complementando a fonte de nitrogênio em substratos com baixo teor deste componente e equilibrando a razão C/N no meio. Por exemplo, a adição de efluente de processamento de papel, que é rico em carbono, a uma mistura de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* spp., resultou num rendimento mais elevado de metano induzido por um equilíbrio entre carbono e nitrogênio na alimentação, bem como aumento da atividade da celulase (YEN, BRUNE, 2007). Óleo de soja e glicerina, ricos em carbono, também demonstraram ter efeitos positivos sobre a produção de biogás, quando adicionados a algas coletadas de lagoas de tratamento de esgoto (SALERNO; NURDOGAN; LUNDQUIST, 2009).

#### 4 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) foi criado em 1996 pelo professor Dr. Jorge Alberto Vieira Costa. Atualmente o laboratório está vinculado à Escola de Química e Alimentos da Universidade e é composto por aproximadamente 50 pessoas, dentre professores e estudantes principalmente dos cursos de Engenharia de Alimentos, Engenharia Química, Engenharia Bioquímica e Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Uma das principais linhas de pesquisa do Laboratório envolve a produção e utilização de biomassa de microalgas, em especial microalgas do gênero *Spirulina*.

O LEB conta com estrutura física de 240 m<sup>2</sup>, incluindo uma estufa de cultivo de microalgas com capacidade de 45 m<sup>2</sup>. Além disso, no extremo sul do Brasil, na cidade de Santa Vitória do Palmar as margens da Lagoa Mangueira, opera uma Planta Piloto de Produção de Microalgas em um terreno de 16 hectares, que conta com uma estufa de cultivo com área de 300 m<sup>2</sup> e um laboratório de controle de 120 m<sup>2</sup> destinados à produção de biomassa de *Spirulina*. Esta planta foi constituída a partir de uma parceria entre LEB, empresas, prefeitura e organizações não governamentais e opera desde 2004, possuindo 2 biorreatores com capacidade de 15 m<sup>3</sup>, com uma produção mensal de 50-70 kg de biomassa.

Neste contexto, o estudo da produção de biogás a partir de biomassa de microalgas teve início em 2005, com a tese de doutorado intitulada Biosistema para Produção de Biomassa Microalgal e Biometano (ANDRADE, 2009); seguindo com a tese de doutorado intitulada Produção e Purificação de Biogás com Microalgas (HENRARD, 2013). Em 2011, os estudos de produção de metano foram ampliados para digestão anaeróbia de macroalgas, através do desenvolvimento da dissertação de mestrado intitulada Produção de Biogás a Partir de Macroalgas (FRANCK, 2013), em que foi testada, inclusive, a co-digestão de biomassa de macro e microalgas.

Em 2004 teve início entre LEB, a ELETROBRÁS (Centrais elétricas brasileiras S. A.) e a CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), localizada no município de Candiota – RS, o desenvolvimento de tecnologia para biofixação de CO<sub>2</sub> originado na combustão do carvão mineral por microalgas. Como produto desta parceria foi projetada, montada e colocada em operação a Planta Piloto de Biofixação de CO<sub>2</sub> por Microalgas, com área de 6.000 m<sup>2</sup>, além de 70 m<sup>2</sup> de laboratórios, possuindo dois biorreatores do tipo raceway, com volumes de 18 m<sup>3</sup> cada e um biorreator com volume de 1 m<sup>3</sup>, para crescimento e manutenção de inóculo. Em 2012, foi firmada a continuidade do convênio

através do projeto P&D da ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica) juntamente com a CGTEE, para colocar em operação a Planta Piloto de Biofixação de gás carbônico.

Uma terceira planta para produção de biomassa microalgal foi colocada em operação na cidade de Ribeirão Preto – SP, para utilização da vinhaça originada da produção de bioetanol.

Em 2008 foi aprovado o projeto Aquicultura de microalgas para a biofixação do gás carbônico gerado na queima do carvão e co-geração de biodiesel e bioprodutos de alto valor agregado, através do Edital MCT/CNPq/MPA 26/2008 (Seleção pública de propostas de pesquisa e tecnologias para produção de biodiesel a partir de microalgas), o qual foi realizado através de uma parceria entre Laboratórios de Engenharia Bioquímica da FURG, CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), Fundação ZERI e UPF.

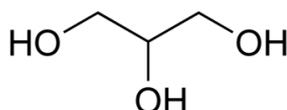
Pesquisas sobre microalgas vêm sendo desenvolvidas no LEB através dos projetos Cooperação Técnica para Obtenção de Biomassa, Bioenergia e Produção do Alto Valor Agregado a Partir de Microalgas e Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos, aprovados pela CAPES.

## 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 Glicerol

O glicerol é um poliálcool com fórmula química  $C_3H_5(OH)_3$  e a sua estrutura química está representada na Figura 1. É o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (DASARI et al., 2005).

**Figura 1** Estrutura do glicerol



Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, dendê, algodão e coco) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (THOMPSON; HE, 2006). O glicerol é também um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de micro-organismos, onde atua como precursor de numerosos compostos, e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (BRISSON et al., 2001; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (THOMPSON e HE, 2006). Em 2012, devido ao aumento exponencial do uso de biodiesel, a produção de glicerol alcançou 1,2 milhões de toneladas (MOTA et al., 2009). Esse resíduo produzido em tamanhas proporções pode facilmente se tornar um passivo ambiental grave, poluindo rios e mangues. Entretanto, o glicerol bruto apresenta ainda grande capacidade energética e pode ser aproveitado após processamento como fonte energética (STRIUGAS, 2009).

Segundo Viana (2011), um grande número de micro-organismos pode crescer em meio contendo glicerol e assim utilizá-lo como fonte de carbono e energia. Este subproduto possui inúmeras possibilidades de aplicações industriais, entretanto o glicerol obtido da produção de biodiesel apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que conferem um baixo valor de comercialização (OOI et al., 2004). Por outro lado, por possuir alto teor de carbono degradável, pode favorecer o processo de co-digestão, e, portanto, viabilizar formas alternativas de utilização que podem proporcionar sustentabilidade econômica e ambiental da produção de biodiesel.

## 5.2 Biomassa de *Spirulina*

As microalgas pertencem a um grupo heterogêneo de organismos, predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, que podem formar colônia, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. São caracterizadas pela presença de pigmentos, responsáveis por coloração variada e por mecanismo foto autotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Andrade, Costa (2008) e Chisti (2007) caracterizaram as microalgas como microorganismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzir várias formas de energia, produzindo biomassa. Podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis e suplementos alimentares, e também podem ser empregadas na captura de dióxido de carbono da atmosfera. As microalgas produzem mais oxigênio do que todas as plantas existentes no mundo, sendo responsáveis por, pelo menos, 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004).

A *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa, com 1 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 2), e se dispõe na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento. Destaca-se das demais microalgas por apresentar elevado teor de proteínas (50 -70%) e ausência de parede celulósica (VONSHAK, 1997), o que favorece a etapa de hidrólise na digestão anaeróbia.

**Figura 2** Vista microscópica de uma *Spirulina*

Fonte: <http://www.antenna.ch/malnutrition>



Ocorrências naturais da *Spirulina* foram registradas nos lagos Chad na África Central, Texcoco no México, Nakaru e Elementeia no Quênia, e Aranguadi na Etiópia (VONSHAK, 1997). No Brasil uma cepa da microalga *Spirulina* foi isolada da Lagoa Mangueira, Rio Grande do Sul (MORAIS et al., 2008).

Desde 23 de junho de 1981 a *Spirulina* foi legalmente aceita como alimento pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que declarou que a *Spirulina* é uma fonte de proteínas e contém várias vitaminas e minerais. Ela pode ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar desde que precisamente qualificada e livre de contaminantes e de adulteração com substâncias (FOX, 1996).

Em relação aos seus constituintes, a *Spirulina* é altamente proteica, conforme pode ser observado na Tabela 1. Entre as proteínas estão presentes as ficocianinas, biliproteínas envolvidas nas reações químicas de fotossíntese e funcionam como reservatório de nitrogênio, sendo que a maior parte da proteína presente equivale a aminoácidos essenciais, com a presença inclusive de metionina, aminoácido ausente na maioria das cianobactérias e microalgas (CIFERRI, 1985; LEÓN, 2010).

**Tabela 1** Composição centesimal da *Spirulina*

Componente	Quantidade (%)
Proteínas e Aminoácidos	65
Carboidratos	20
Minerais	7
Lipídeos	5
Umidade	3

Fonte: Adaptado de HENRIKSON (1994).

A parede celular da microalga *Spirulina* é constituída de mureína (FALQUET, 1997), um peptideoglicano formado por N-acetilglicosamina (NAG), ácido N-acetil murâmico (NAM) e um peptídeo constituído por quatro aminoácidos. Devido ao tamanho dos filamentos, entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  (TOMASELLI, 1997), podendo alcançar 1 mm, a recuperação da biomassa do meio líquido é facilitada (TEFERA, 2009). A microalga *Spirulina* ocorre naturalmente no extremo sul do Brasil (MORAIS et al., 2008) e já demonstrou capacidade de fixação de  $\text{CO}_2$  de gases de combustão (MORAIS e COSTA, 2008; RADMANN e COSTA, 2008).

### 5.3 Produção de *Spirulina* através da fixação de $\text{CO}_2$ industrial

A biofixação de  $\text{CO}_2$  por microalgas é uma tecnologia baseada na capacidade que esses micro-organismos possuem de realizar fotossíntese. A fotossíntese é a principal rota de

fixação de carbono das microalgas, sendo a luz solar sua principal fonte de energia. Neste processo, os nutrientes são convertidos em matéria orgânica com liberação de oxigênio (VONSHAK, 1997).

A combinação do cultivo de microalgas com a biofixação de CO<sub>2</sub> do efluente gasoso gerado a partir da queima de combustíveis fósseis e outras fontes pode reduzir o custo de produção de microalgas em escala industrial e compensar as emissões de carbono geradas na produção de energia (MORAIS, COSTA, 2007).

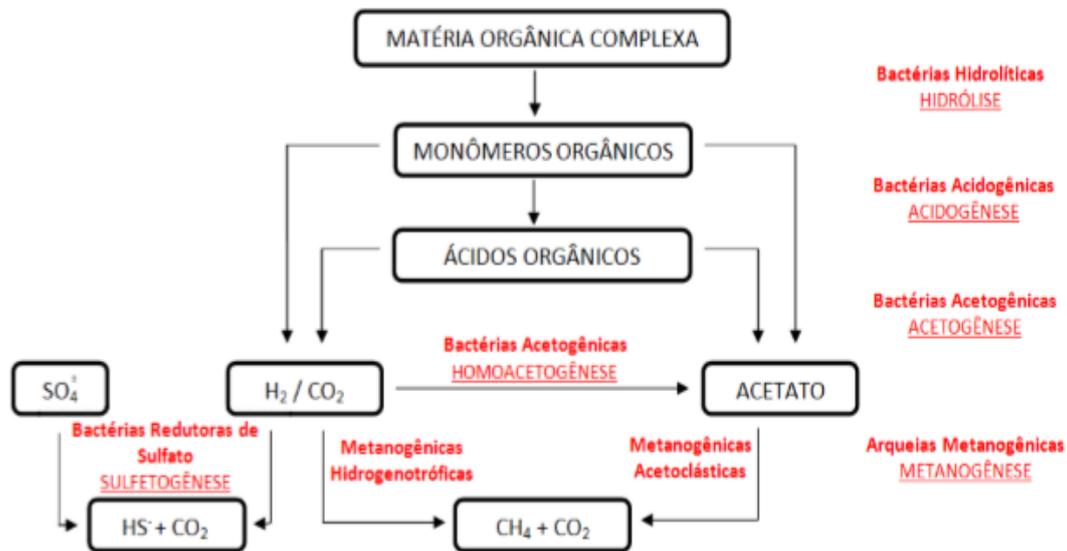
Radmann et al. (2011) realizaram estudo e desenvolveram uma planta piloto para biofixação de CO<sub>2</sub> oriunda da Usina Termelétrica Presidente Médici, com o objetivo de utilizar gás de combustão da usina para o cultivo das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Scenedesmus obliquus* LEB 22, determinando suas características cinéticas e capacidade de fixação de CO<sub>2</sub>. Nesse estudo observaram que a utilização de gás de combustão da usina termelétrica incrementou em 35 % a produção de biomassa ao final do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, com redução de 24,2% da concentração de CO<sub>2</sub> do gás de combustão, sendo biofixado 5,7% do CO<sub>2</sub> para o crescimento das microalgas. Os resultados mostram que as microalgas podem ser cultivadas em plantas de energia elétrica para biofixar o CO<sub>2</sub> proveniente do gás de combustão de carvão e contribuir para redução do aquecimento global.

#### **5.4 Fundamentos da Digestão Anaeróbia**

A digestão anaeróbia é o processo biológico onde o material orgânico, na ausência de oxigênio, é convertido a biogás. O biogás é composto principalmente por metano e dióxido de carbono. De forma geral, substratos com elevado teor de lipídios e elevada biodegradabilidade, bem como baixo teor de compostos lignocelulósicos, apresentam elevados rendimentos de produção de biometano neste processo (LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2011).

No processo global de conversão da matéria orgânica, através da digestão anaeróbia, podem-se distinguir quatro fases distintas para formação do metano: a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese (SILVA, 2009). A Figura 3 demonstra o esquema geral da biodigestão anaeróbia, adaptado de Chernicharo (1997).

**Figura 3** Esquema simplificado da digestão anaeróbia de matéria orgânica para obtenção de metano



#### 5.4.1 Hidrólise

Nesta fase as bactérias anaeróbias facultativas (bactérias hidrolíticas) transformam os polímeros orgânicos em compostos simples e solúveis de menor massa molecular (monômeros) e através de enzimas extracelulares, estes últimos em acetato, hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos de cadeia curta, aminoácidos e outros produtos como glicose (CHERNICHARO, 1997). O tempo necessário para que esta etapa ocorra depende da composição do substrato utilizado: carboidratos degradam mais rapidamente, enquanto que proteínas e lipídios demoram mais tempo (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009). Já a degradação de compostos com composição complexa, como os lignocelulósicos, é lenta e incompleta (DEUBLEIN, STEINHAUSER, 2008). Assim, para substratos de composição complexa, esta etapa pode ser limitante (APPELS et al., 2008).

#### 5.4.2 Acidogênese

A acidogênese caracteriza-se por ser um processo bioquímico em que as bactérias obtêm energia transformando matéria orgânica hidrolisada (CHERNICHARO, 1997). Na acidogênese as bactérias formadoras de ácidos (bactérias fermentativas) são conhecidas como produtoras de hidrogênio e convertem os produtos oriundos da hidrólise em ácidos graxos

voláteis, alcoóis, ácido lático, gás carbônico, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio (AZEVEDO, 2010).

### 5.4.3 Acetogênese

Os produtos formados nas etapas anteriores são utilizados como substrato para os micro-organismos acetogênicos. Bactérias acetogênicas, produtoras de hidrogênio, metabolizam ácidos graxos de cadeia longa via  $\beta$ -oxidação, ácidos voláteis com três ou mais átomos de carbono e compostos neutros maiores que metanol, acetato,  $H_2$  e  $CO_2$  (MENES, 2007). Embora as bactérias acetogênicas sejam produtoras de  $H_2$ , estas sobrevivem somente em baixas pressões de hidrogênio ( $<10^{-3}$  atm). Por esta razão, estas bactérias vivem em simbiose com as metanogênicas, pois estas consomem o hidrogênio, diminuindo assim sua pressão parcial no meio (SALMINEN, RINTALA, 2002).

### 5.4.4 Metanogênese

A fase de metanogênese constitui a etapa final no processo de degradação anaeróbia e pode ser subdividida por dois grupos de bactérias: as hidrogenotróficas e as acetotróficas. As bactérias acetotróficas produzem metano a partir da redução de ácido acético, enquanto as que produzem metano a partir do hidrogênio e do dióxido de carbono são classificadas como hidrogenotróficas (AZEVEDO, 2010).

As bactérias que produzem metano a partir de hidrogênio crescem mais rapidamente em comparação com as que utilizam ácido acético, de modo que as metanogênicas acetotróficas normalmente limitam a velocidade de transformação de material orgânico complexo (CHERNICHARO, 1997).

O volume de metano produzido é um indicador do bom ou mau funcionamento do processo de digestão anaeróbia. Quando ocorre um desequilíbrio do processo, o primeiro sinal é a redução na quantidade de gases produzidos, o que ocorre antes mesmo da elevação na concentração de ácidos voláteis. A eficiência da digestão anaeróbia é controlada pelo tipo de resíduo a ser digerido, concentração, temperatura, presença de materiais tóxicos, o pH, a alcalinidade, e a proporção de alimentação para os micro-organismos (BURKE, 2001).

Atualmente, a digestão anaeróbia é considerada como uma importante alternativa para o tratamento de diferentes tipos de resíduos com elevadas concentrações de material orgânico, devido aos baixos custos operacionais e por oferecer alternativa para substituição de combustíveis fósseis, minimizando a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa (TICM, 2007). A Tabela 2 apresenta o rendimento na produção de metano para diferentes substratos.

Para um bom desempenho no processo de digestão anaeróbia, é imprescindível que os compostos orgânicos sejam convertidos em precursores imediatos do metano. Caso essa conversão não ocorra, a metanogênese não ocorrerá, acarretando no acúmulo dos produtos da fase de hidrólise e fermentação no reator, comprometendo o processo. É importante que o biorreator anaeróbio seja inoculado com um lodo rico em micro-organismos metanogênicos, de qualidade, melhorando consideravelmente o sistema em relação à partida do mesmo (FORESTI, 1999).

**Tabela 2** Produção de metano a partir da digestão anaeróbia de diversos substratos

<b>Substrato</b>	<b>Produção de CH<sub>4</sub> (m<sup>3</sup>.kg<sup>-1</sup> SV)</b>	<b>Referência</b>
<i>Ulva</i> sp.	0,16-0,27	Bruhn et al., 2011
Glicerol	0,513	Hutnan et al., 2009
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	0,56	Andrade, 2009
Resíduos de vegetais e frutas	0,383	Gunaseelan, 1997
Resíduos de cenoura	0,417	Gunaseelan, 1997
Resíduos de tomate	0,42	Gunaseelan, 1997
Óleo de peixe	0,6-0,8	Bruhn et al., 2011
Lodo de esgoto	0,243	Labatut et al., 2011
Madeira	0,32	Gunaseelan, 1997
Resíduos de matadouro	0,57	Bruhn et al., 2011
Resíduos municipais	0,43	Gunaseelan, 1997

\*Produção de metano, em metro cúbico por quilograma de sólidos voláteis presentes na biomassa.

### **5.5 Bioquímica da digestão anaeróbia de glicerol**

Um grande número de micro-organismos pode crescer em meio contendo glicerol e utilizá-lo como fonte de carbono e energia. Essa assimilação pode ocorrer por transporte passivo (VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993) ou transporte ativo (HOLST et al., 2000), tanto em condições aeróbias (RYWINSKA et al., 2009; SCHULLER, 2003) quanto em condições

anaeróbias (YAZDANI e GONZALEZ, 2007; DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006).

As rotas metabólicas fermentativas de glicerol já estão bem estabelecidas e, de acordo com Biebl et al. (1999), podem ocorrer por via redutora ou por via oxidativa. Pela via redutora o glicerol sofre um processo de hidratação, intermediado pela co-enzima glicerol desidratase, produzindo 3-hidroxi propionaldeído, que por sua vez é reduzido a 1,3-propanediol (1,3-PDO), mediado pela enzima 1,3-propanediol desidrogenase. A rota oxidativa consiste em desidrogenar o glicerol, através da enzima glicerol desidrogenase, formando o composto dihidroxiacetona que, após sofrer fosforilação por intermédio da enzima dihidroxiacetona quinase, pode ser convertido a succinato, que é posteriormente convertido a propionato, ou a piruvato. As reações que levam à formação de compostos a partir de piruvato variam de acordo com as condições ambientais e com as enzimas que mediam a reação, ou seja, de organismo, podendo originar compostos mais simples, tais como 2,3-butanediol, lactato, butirato, etanol, formiato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; BIEBL et al., 1999). O esquema das rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples está apresentado na Figura 4.

Quando o processo anaeróbico visa a geração de energia, devem estar presentes micro-organismos formadores de formiato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (na forma de íon bicarbonato), uma vez que estes são os únicos compostos que podem ser convertidos diretamente a metano (VIANA, 2011)

Contudo, nem todas as reações de acetogênese ocorrem espontaneamente sob condições ambientais padrões (pH neutro, 25 °C e 1 atm), como é o caso do propionato, butirato e etanol, sendo necessário que haja um mecanismo de remoção de H<sub>2</sub> do meio, e assim ocorra o deslocamento da reação no sentido de formar acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (na forma de íon bicarbonato). O principal mecanismo de remoção de H<sub>2</sub> do meio é o seu consumo pelas archaeas metanogênicas hidrogenotróficas. Quando este consumo é suficiente para manter uma pressão de H<sub>2</sub> no meio entre 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> atm, a degradação de propionato, butirato ou etanol se torna exergônica, liberando energia para as bactérias acetogênicas, tornando essas reações termodinamicamente favoráveis (LETTINGA et al., 1999). Posteriormente, os subprodutos da acetogênese são assimilados por archaeas metanogênicas acetoclásticas e convertidos a CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.



ácidos graxos de cadeia longa (HAZIMAH; OOI; SALMIAH, 2003; YONG et al., 2001), sais inorgânicos de cloretos (CARMONA et al., 2009), sulfatos (MA et al., 2008) e sulfetos (HULSHOFF et al., 1998), formados a partir de compostos sulfurosos, causando inibição da atividade, em especial as do domínio archaeas metanogênicas.

## 5.6 Co-digestão

A co-digestão anaeróbia, segundo Alvarez e Lidén (2008), é a decomposição de dois ou mais tipos de substratos. Mata-Alvarez, Macé e Llabrés (2000) mencionam que o uso de co-substrato pode ajudar a estabelecer a umidade requerida para o processo de digestão. No entanto, o desempenho do processo de co-digestão anaeróbia é muito dependente dos tipos e da composição do material orgânico a ser degradado (SOSNOWSKI et al. 2003).

Um dos principais problemas para o processo de co-digestão reside no equilíbrio carbono/nitrogênio (C/N), sendo que os valores ótimos para a relação C/N estão dentro da faixa de 20 a 30 (ZHONG et al., 2012).

O glicerol bruto oriundo da produção do biodiesel, pelas suas características físico-químicas e por apresentar alto teor de carbono de alta digestibilidade em sua constituição, representa uma fonte de energia para os micro-organismos. Porém, pela ausência de nitrogênio e de outros nutrientes em sua composição, o glicerol bruto não pode ser aproveitado como substrato único. É necessária a adição de outros substratos ricos em nitrogênio e minerais para completar a oferta de nutrientes aos micro-organismos. Desta forma, a adição de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, que contém elevado teor de nitrogênio, pode facilitar o processo de produção de biogás.

Segundo Yen e Brune (2007), a adição de efluente de processamento de papel, que é rico em carbono a uma mistura de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* spp., resultou num rendimento melhor de metano induzido por um equilíbrio entre carbono e nitrogênio na alimentação.

O uso alternativo do glicerol adicionado a substratos em processo de co-digestão anaeróbia com intuito de gerar energia é considerado viável, segundo estudos já realizados. BACKES (2011) avaliou o processo de co-digestão anaeróbia na geração de energia a partir dos dejetos de suínos e bovinos de leite com suplementação de glicerol nas dosagens de 0, 3, 6 e 9% do volume, e concluiu que a glicerina bruta associada aos dejetos de suínos na concentração de 6% proporcionou significativa produção de biogás (120L) comparada aos demais tratamentos com 0, 3 e 9% que apresentaram as produções de 30L, 60L e 70L, respectivamente.

Fountoulakis et al. (2010), utilizando um reator anaeróbio, com 3 L de volume útil, degradando lodo de descarte, foi suplementado com glicerol 1 % (v/v) no 33º dia de operação. A soma do volume diário de metano equivalente à digestão de lodo de descarte (1,11 L.d<sup>-1</sup>) e glicerol (0,75 L.d<sup>-1</sup>) foi de 1,86 L.d<sup>-1</sup>. Como a produção diária de metano ao final dos 80 dias de experimento, com suplementação de glicerol, foi igual a 2,35 L.d<sup>-1</sup>, conclui-se que 0,5 L.d<sup>-1</sup> foi produzido devido a ação do glicerol como co-substrato, comprovando o aumento de 42% na produção diária de CH<sub>4</sub>.

A co-digestão anaeróbia apresenta como benefícios: diluição de substâncias tóxicas dos resíduos, favorecendo o equilíbrio de nutrientes; favorecimento do consórcio de micro-organismos, aumentando a carga de matéria orgânica biodegradável, favorecendo a produção de biogás (SOSNOWSKI et al., 2003).

## 5.7 Biogás

O biogás é o produto da digestão anaeróbia, formado a partir da degradação da matéria orgânica. Pode ser produzido a partir de uma grande variedade de resíduos orgânicos, como resíduos de animais e vegetais, lodo de esgoto, resíduos sólidos municipais ou efluentes industriais (NOYOLA et al., 2006).

A composição típica do biogás é cerca de 60% de metano, 35% de dióxido de carbono e 5% de uma mistura de hidrogênio, nitrogênio, amônia, ácido sulfídrico, monóxido de carbono, aminas voláteis e oxigênio (WEREKO-BROBBY, GAGEN, 2000). A Tabela 4 ilustra um comparativo da equivalência energética do biogás em comparação a outros combustíveis.

A composição do biogás depende da composição e da concentração de material orgânico que contém a biomassa, das condições físico-químicas do processo, como pH, alcalinidade, temperatura e da presença de outros compostos como sulfatos e nitratos (NOYOLA et al., 2006). Quanto maior for o conteúdo de sólidos voláteis, os quais representam a quantidade de sólidos orgânicos presentes na amostra, e a disponibilidade de nitratos e fosfatos, maior será a produção de biogás.

**Tabela 3** Comparativo energético do biogás com outros combustíveis

<b>Combustíveis</b>	<b>1 m<sup>3</sup> de biogás equivale a</b>
Gasolina	0,613 L
Querosene	0,579 L
Óleo Diesel	0,553 L
GLP	0,454 L
Lenha	1,536 kG
Álcool hidratado	0,790 L
Eletricidade	1,428 kWh

Fonte: GASPAR (2003)

O biogás produzido no processo de digestão anaeróbia pode ser utilizado para diversos fins, como: uso em caldeiras ou dispositivos de aquecimento, combustível veicular, assim como o gás natural, co-geração de calor e eletricidade, entre outros (NOYOLA et al., 2006).

### 5.8 Relação C/N

As concentrações de Carbono e Nitrogênio são determinantes para o desempenho do processo de digestão anaeróbia, sendo que estes elementos constituem um fator limitante ao processo. Considerando-se que o carbono na forma de carboidratos é usado pelas bactérias para a obtenção de energia para o seu metabolismo celular, e o nitrogênio existente nas proteínas e nitratos também é utilizado pelas bactérias na construção das estruturas celulares e na síntese proteica (IGONI et al., 2008). Assim, é importante o controle da razão C/N no meio, pois no decorrer das etapas de produção de biogás, os micro-organismos consomem cerca de 25 a 30 vezes mais carbono que nitrogênio, e para atender a esse requisito, estes necessitam de uma proporção entre carbono e nitrogênio (C/N) na biomassa que varie de 20 a 30 (ZHONG et al., 2012).

Relações inadequadas podem resultar em acúmulo de produtos intermediários no digestor, como nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis, potencializando a inibição do processo através da diminuição da atividade metanogênica. A relação C/N ideal varia com o tipo de substrato a ser digerido (LI, STEPHEN, PARK, 2011). Por isso, é necessário que haja um equilíbrio entre as concentrações desses elementos químicos presentes no processo de co-digestão anaeróbia.

A razão C/N para biomassa de microalga foi 4,87 e de glicerol  $3,3 \times 10^3$  (Tabela 8). Embora este valor esteja abaixo do recomendado por alguns autores para digestão anaeróbia, Andrade (2009) realizou digestão anaeróbia de *Spirulina* sp. LEB 18, com razão C/N de 4,37, obtendo conversão de biomassa em biometano de  $0,3 \text{ g.g}^{-1}$ .

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Inóculo

Como inóculo foi utilizado 0,44 L de lodo granular anaeróbio ( $85,88 \text{ g.L}^{-1}$  de sólidos voláteis), composto por uma cultura mista de micro-organismos anaeróbios proveniente do tratamento de água residual de parboilização de arroz da Empresa Nelson Wendt (Pelotas – RS, Brasil). O lodo foi adaptado à biomassa de microalgas e a suspensões de glicerol bruto até estabilização do processo.

### 6.2 Substratos

Como substrato foram utilizadas diferentes composições de biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol bruto. O glicerol utilizado foi proveniente da Empresa BSBIOS, localizada na cidade de Passo Fundo – RS, Brasil. A biomassa de microalga foi cultivada em uma unidade piloto de produção de *Spirulina*, em Santa Vitória do Palmar-RS, Brasil ( $33^{\circ}30\text{S}$ ,  $53^{\circ}08\text{W}$ ) (MORAIS et al., 2008). Como meio de cultivo para produção da biomassa foi utilizada água da Lagoa Mangueira complementada com meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Para a produção de biogás, a biomassa de *Spirulina* foi separada do meio líquido por filtração, prensada para eliminação de água, seca em estufa a  $40^{\circ}\text{C}$ , moída em moinho de bolas e conservada a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior alimentação do biorreator anaeróbio.

Os ensaios foram divididos em dois grupos, sendo os ensaios E1, E2, E3 e E4 incluídos no primeiro grupo (Tabela 4) e os ensaios E5, E6 e E7 incluídos no segundo grupo (Tabela 5). Os ensaios E5, E6 e E7 foram uma continuação dos ensaios E2, E3 e E4 respectivamente, com um aumento de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  na concentração de glicerol no ensaio E5; no ensaio E6 houve um acréscimo de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de *Spirulina* e no ensaio E7 foi retirada a alimentação de *Spirulina* sendo o ensaio alimentado somente com glicerol.

**Tabela 4** Composição da alimentação de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol e razão C/N obtida para o primeiro grupo de experimentos

<b>Ensaio</b>	<b>Biomassa de <i>Spirulina</i> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Suspensão de glicerol (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Composição da alimentação (g.L<sup>-1</sup>) (<i>Spirulina</i>+glicerol)</b>	<b>Razão C/N</b>
E1(10Sp)	10	-	10	4,9
E2(10Sp+5G)	10	5	15	6,7
E3(5Sp+5G)	5	5	10	9,3
E4(1Sp+5G)	1	5	6	23,7

**Tabela 5** Composição da alimentação de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol e razão C/N obtida para o segundo grupo de experimentos

<b>Ensaio</b>	<b>Biomassa de <i>Spirulina</i> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Suspensão de glicerol (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Composição da alimentação (g.L<sup>-1</sup>) (<i>Spirulina</i>+glicerol)</b>	<b>Razão C/N</b>
E5(10Sp+10G)	10	10	20	8,7
E6(15Sp+5G)	15	5	20	6,1
E7(5G)	-	5	5	3,2×10 <sup>3</sup>

A caracterização do glicerol utilizado foi realizada pela empresa fornecedora e pode ser visualizada na Tabela 6. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi caracterizada quanto ao teor de umidade e cinzas segundo metodologia oficial (AOAC, 2000); lipídios pelo método de Folch (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957) carboidratos por uma adaptação de MILLER (1959), com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos (FURLAN et al., 2009); o teor de proteínas foi calculado a partir do teor de nitrogênio da análise elementar (OHSE et al., 2009), utilizando como fator de conversão de 5,22, específico para biomassa de *Spirulina* (LOURENÇO et al., 1998; LOURENÇO et al., 2004); e para o efluente foi utilizado o fator de conversão de 6,25 (OHSE et al., 2009), carboidratos foram determinados por diferença. Tabela 7 apresenta a composição proximal da biomassa de *Spirulina* utilizada como substrato para produção de biogás.

**Tabela 6** Caracterização do glicerol bruto

<b>Análises</b>	<b>Resultado (%)</b>	<b>Método</b>
Umidade	12,72	AOCS Ca 2e-84
Glicerol	80,93	Official Mon. XXI
Cinza	5,36	Official Mon. XXI
Cloretos	5,90	Método de Mohr
pH	5,18	-
MONG*	0,99	Cálculo

\*Matéria orgânica não glicerínosa

**Tabela 7** Composição proximal da biomassa de *Spirulina* utilizada para produção de biogás

<b>Componente</b>	<b>Concentração (% p/p)</b>
Carboidratos	14,30 ± 0,23
Lipídios	10,39 ± 0,28
Proteínas	44,73 ± 0,10
Umidade	14,51 ± 0,10

A análise da composição elementar da biomassa e do glicerol foi realizada pelo Laboratório de Hidroquímica /Instituto de Oceanografia – FURG. O equipamento utilizado foi um analisador elementar CHNS/O, Modelo 2400 Serie II (Perkin Elmer; USA). A calibração do equipamento foi realizada utilizando o material de referência certificado acetanilida. O resultado da análise pode ser visualizado na Tabela 8.

**Tabela 8** Composição elementar da biomassa de *Spirulina* e glicerol

<b>Amostra</b>	<b>% C (p/p)</b>	<b>% H (p/p)</b>	<b>% N (p/p)</b>
Biomassa de <i>Spirulina</i>	41,76	6,60	8,57
Glicerol bruto	32,57	2,69	0,01

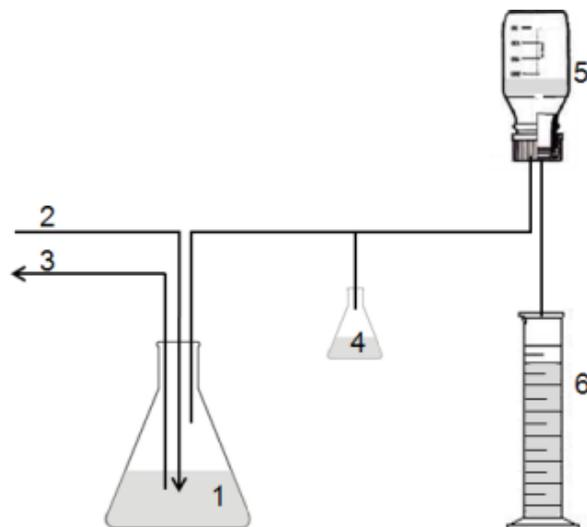
### 6.3 Biorreatores e Condições Operacionais

Os ensaios foram realizados em 7 biorreatores anaeróbios de 2 L (Figura 5), com volume útil de 1,5 L, a 35 °C em incubadora com controle de temperatura (J. Prolab, R360,

Brasil). Os biorreatores foram operados em batelada sequencial (SCHMIDELL et al., 2001), com ciclos diários de alimentação, reação, decantação e retirada do efluente líquido.

Os biorreatores foram equipados com sistema de coleta de gás, esvaziamento e alimentação. O pH dos ensaios E3, E4 e E7 foi ajustado diariamente para 6,9 - 7,0, e a homogeneização dos biorreatores foi realizada uma vez ao dia, após alimentação.

**Figura 5** Aparato experimental para a produção de biogás a partir da co-digestão anaeróbia de *Spirulina* sp. LEB 18 e glicerol bruto: (1) biorreator anaeróbio, (2) entrada de alimentação (3) saída do efluente líquido, (4) frasco de segurança, (5) gasômetro de frasco invertido, (6) proveta coletora de água (adaptado de ANDRADE, 2009).



#### 6.4 Determinações Analíticas

A cada 84 h no efluente líquido dos biorreatores, foram determinados o teor de sólidos totais, sólidos voláteis e alcalinidade conforme metodologia oficial (APHA, 1998) e concentração de nitrogênio amoniacal pelo método de Nessler (NESSLER, 1856). O volume de biogás produzido diariamente foi determinado por gasômetro de frasco invertido (JIMÉNEZ; BORJA; MARTÍN, 2004), e corrigido a condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Após a estabilização do volume diário de biogás produzido o gás foi armazenado em “sample bag” Figura 9 (anexo) e sua composição ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) foi determinada por cromatografia gasosa (GC CP 3800 Varian, NDL).

### 6.5 Respostas avaliadas

A produção específica de biogás foi calculada através da razão do volume de biometano produzido diariamente e corrigido nas CNTP e o volume útil do biorreator, através da Equação 1:

$$\text{Produção específica de biogás (d}^{-1}\text{)} = \frac{V_{\text{Biogás}}}{V_{\text{útil do biorreator}}} \quad \text{Equação (1)}$$

A decomposição da fração orgânica da alimentação do biorreator foi determinada através do balanço de sólidos, considerando a entrada e a saída de sólidos no efluente dos biorreatores, através da Equação 2:

$$\text{Decomposição da fração orgânica da alimentação (\%)} = \frac{(X_{\text{org entra}} - X_{\text{org sai}}) \cdot 100}{X_{\text{org entra}}}$$

Equação (2)

A conversão de sólidos voláteis da biomassa em biometano ( $Y_{\text{CH}_4/\text{SV}}$ ) foi calculada como a razão entre o volume de biometano produzido diariamente nas CNTP e a fração orgânica da alimentação decomposta, segundo a Equação 3:

$$Y_{\text{CH}_4/\text{SV}} (\text{mL. g}^{-1}) = \frac{V_{\text{biometano}}}{(X_{\text{org entra}} - X_{\text{org sai}})} \quad \text{Equação (3)}$$

As conversões do carbono em biometano ( $Y_{\text{C CH}_4/\text{C alim}}$ ), dióxido de carbono ( $Y_{\text{C CO}_2/\text{C alim}}$ ) e alcalinidade ( $Y_{\text{C HCO}_3^-/\text{C alim}}$ ) nos diferentes ensaios foram determinados pelo balanço de massa para o carbono.

### 6.6 Análise estatística

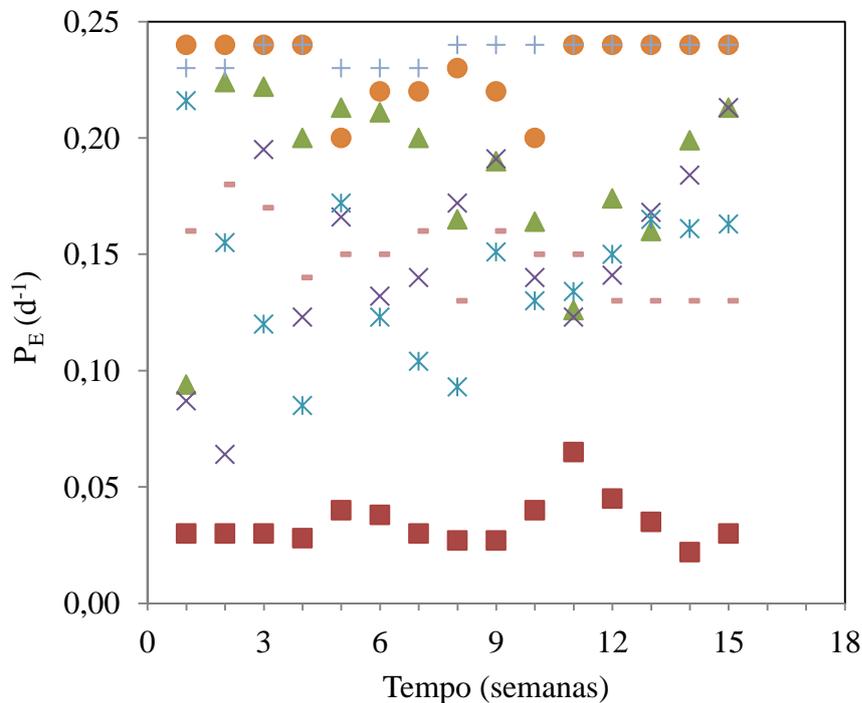
As médias dos resultados obtidos foram comparadas através da Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey, com 95 % de significância estatística ( $\alpha$ ),  $p < 0,05$ .

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As produções específicas de biogás ao longo do tempo para cada um dos ensaios realizados apresentam-se na Figura 6. A produção específica de biogás nos ensaios com utilização de glicerol foi superior ao ensaio em que a alimentação era realizada com a biomassa microalgal. Os maiores valores de produção específica de biogás foram encontrados para os ensaios E5 e E6 (0,23 e 0,24 d<sup>-1</sup>) (Tabela 9), os quais apresentavam relação biomassa microalgal:glicerol de 1:1 e 3:1, respectivamente (razão C/N de 8,7 e 6,1, e concentração de alimentação de 20 g.L<sup>-1</sup> para ambos os ensaios). Valores de razão C/N semelhantes utilizadas nos ensaios E2 e E3 (6,7 e 9,3, respectivamente) resultaram em decréscimo nos valores de P<sub>E</sub>, o que ocorre devido a menor concentração de alimentação utilizada nestes últimos (15 e 10 g.L<sup>-1</sup>). A proporção de cada substrato na alimentação de biorreatores anaeróbios é um parâmetro operacional de grande importância, uma vez que os substratos têm procedências e composições diferentes e apresentam, em função disso, diferentes biodegradabilidades.

Os ensaios de co-digestão com a menor concentração de alimentação total (E4, 6 g.L<sup>-1</sup>; e E7, 5 g.L<sup>-1</sup>) apresentaram os menores valores de P<sub>E</sub> (0,14 e 0,15 d<sup>-1</sup>). Durante as primeiras semanas de experimentos estes ensaios apresentaram uma diminuição do pH a níveis de 5,5 que inibem a atividade metanogênica (VAN HAANDEL, LETTINGA, 1994). Além de apresentar as menores concentrações de alimentação, nestes ensaios a concentração de biomassa de *Spirulina* alimentada era a mais baixa (1 g.L<sup>-1</sup>, E4) e nula (E7), respectivamente. A utilização de glicerol na alimentação provocou aumento na produção de biogás, porém a quantidade de glicerol adicionado ao substrato deve ser analisada com cautela, conforme relataram Fountoulakis, Petousi, Manios, (2010). Segundo estes autores o glicerol pode ser aplicado vantajosamente no processo de digestão anaeróbia, mas é necessário ter uma estratégia rigorosa a fim de controlar a quantidade acrescentada de glicerol ao substrato, evitando-se o risco de sobrecarga orgânica no reator anaeróbio. Não foram observados problemas de sobrecarga orgânica nos biorreatores nesta pesquisa, como por exemplo: não produção de biogás, pH, alcalinidade e nitrogênio amoniacal fora da faixa ideal para o processo de digestão anaeróbia.

**Figura 6** Produção específica de biogás ( $P_E$ ) nos ensaios com alimentação de: E1 (■), E2 (▲), E3 (×), E4 (\*), E5 (●), E6 (+) e E7(-)



Os ensaios de co-digestão de biomassa de *Spirulina* e glicerol que apresentaram os valores máximos de produção específica de biogás foram aqueles que continham uma maior concentração de biomassa de *Spirulina* na alimentação E2, E5 e E6 ( $0,19 \text{ d}^{-1}$ ,  $0,23 \text{ d}^{-1}$  e  $0,24 \text{ d}^{-1}$ ) (Tabela 9).

O ensaio E1, que apresentava apenas biomassa de *Spirulina*, apresentou a menor produção específica de biogás ( $0,03 \text{ d}^{-1}$ ). Os valores encontrados no presente trabalho estão na faixa relatada na literatura. Baba et al. (2013) realizaram a digestão anaeróbia de glicerol bruto em uma escala piloto em processo contínuo, taxa de alimentação de glicerol variando entre  $1,7 \cdot 10^{-4}$  e  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$ , e obtiveram produções específicas de biogás entre  $0,08$  e  $0,67 \text{ d}^{-1}$ .

A Tabela 9 apresenta a decomposição da fração orgânica da biomassa alimentada para os diferentes ensaios. A decomposição do substrato na digestão anaeróbia é função da composição do substrato e fatores físico-químicos e operacionais do processo. Como os processos foram realizados sob as mesmas condições, a diferença na decomposição pode ser atribuída à composição química de ambos os substratos utilizados. A decomposição que ocorreu nos ensaios E1, E2, E3, E5 e E6 pode estar relacionada com a ausência de parede celulósica na *Spirulina*, facilitando a hidrólise de sua biomassa (TOMASELLI, 1997). Quando a relação de *Spirulina* para glicerol foi diminuída houve decréscimo nos valores de

decomposição, sendo encontrado o menor valor (44,33 %) quando da alimentação com apenas 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Isso porque a adição de glicerol aumenta a quantidade de sólidos voláteis, pois a fonte de carbono orgânico adicional estimula o crescimento de biomassa ativa no reator (FOUNTOULAKIS; PETOUSHI; MANIOS, 2010; MA et al.; 2008).

Embora o ensaio em que houve alimentação apenas com biomassa de *Spirulina* tenha apresentado alta decomposição da matéria orgânica no processo (86,27%), este apresentou a mais baixa conversão de sólidos voláteis em biometano ( $Y_{CH_4/SV} = 0,03 \text{ L.g}^{-1}$ ). Isto ocorre devido à composição da biomassa de *Spirulina*, a qual, quando decomposta no processo dá origem a outros produtos que não acetato, CO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>, não sendo diretamente convertidos a CH<sub>4</sub>. Por outro lado, nos ensaios com presença de glicerol na alimentação, os valores de conversão dos sólidos voláteis em biometano apresentaram tendência a aumentar (Tabela 9), sendo que aquele alimentado apenas com glicerol (E7) apresentou os maiores valores de conversão da matéria orgânica ao biocombustível ( $Y_{CH_4/SV} = 1,70 \text{ L.g}^{-1}$ ). Diferentemente da microalga, o glicerol é decomposto diretamente a acetato, ou outros ácidos graxos voláteis que, após convertidos a acetato, este é diretamente convertido a CH<sub>4</sub>.

**Tabela 9** Produção específica de biogás, decomposição da fração orgânica da alimentação e conversão de sólidos voláteis em biometano ( $Y_{CH_4/SV}$ )

Ensaio	Produção específica de biogás (d <sup>-1</sup> )	Decomposição da matéria orgânica alimentada (%)	$Y_{CH_4/SV} \text{ (L.g}^{-1}\text{)}$
E1(10 Sp)	0,03 ± 0,01 <sup>c</sup>	86,27 ± 4,14 <sup>a, b</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>c</sup>
E2(10Sp +5G)	0,19 ± 0,03 <sup>a, b</sup>	89,58 ± 4,08 <sup>a, b</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>b, c</sup>
E3(5Sp +5G)	0,15 ± 0,04 <sup>b</sup>	71,64 ± 9,81 <sup>a, b</sup>	0,53 ± 0,18 <sup>b, c</sup>
E4(1Sp +5G)	0,14 ± 0,03 <sup>b</sup>	68,33 ± 7,42 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,02 <sup>b</sup>
E5(10Sp +10G)	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	92,14 ± 2,11 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>c</sup>
E6(15Sp +5G)	0,24 ± 0,00 <sup>a</sup>	92,81 ± 1,38 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>c</sup>
E7(5G)	0,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	44,33 ± 16,87 <sup>c</sup>	1,70 ± 0,31 <sup>a</sup>

Letras iguais dentro de cada coluna referem-se a médias estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ).

A Tabela 10 apresenta valores de referência de dados encontrados na literatura para a digestão e ou co-digestão de glicerol.

**Tabela 10** Produção específica de biogás, decomposição da fração orgânica da alimentação e conversão de sólidos voláteis em biometano ( $Y_{CH_4/SV}$ ) encontrados na literatura

Referência	Condições de cultivo	Produção específica de biogás ( $d^{-1}$ )	Decomposição da matéria orgânica alimentada (%)	$Y_{CH_4/SV}$ ( $L.g^{-1}$ )
El-Mashad e Hamed (2013)	Co-digestão da <i>Spirulina platensis</i> com gramínea			0,24
Chen et al. (2008)	Co-digestão anaeróbia de glicerol com dejetos bovinos			0,14
Athanasoulia, Melidis, Aivasidis (2014)	Co-digestão glicerol bruto em concentrações de 2 e 3 % (v/v)		23,4 – 28,7 %	
Fountoulakis e Manios (2009)	Mistura de águas residuais do processamento do azeite + águas residuais de matadouros (1:4), suplementado em 1 % (v/v) de glicerol bruto		64,6 %	
Robra et al. (2010)	Digestão anaeróbia de glicerol – processo contínuo, taxa de alimentação de 1,3 g $SV.L^{-1}.d^{-1}$			0,83
Astals et al. (2012)	Digestão anaeróbia de glicerol – processo contínuo, taxa de alimentação de 1,275 g $SV.L^{-1}.d^{-1}$			0,78
Henrard (2013)	Digestão anaeróbia de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em escala de bancada	0,38		
Henrard (2013)	Digestão anaeróbia de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em escala piloto	0,27		

O pH e a alcalinidade são parâmetros importantes, que dizem respeito à estabilidade do processo de digestão anaeróbia. A variação do pH ao longo do tempo é apresentada na Tabela 11, não havendo diferença significativa entre todos os ensaios ( $p >$

0,05). Para os ensaios E1 com alimentação contendo 10 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *Spirulina* e E6 com alimentação de 15 g.L<sup>-1</sup> de biomassa *Spirulina* e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, os valores de pH mantiveram-se acima da neutralidade. No entanto, para os ensaios E3 com alimentação de 5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *Spirulina* e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol; E4 alimentado com 1 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *Spirulina* e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol; e E7 alimentado com 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol sem adição de biomassa microalgal, verificou-se diminuição dos valores de pH nos primeiros dias de experimento para valores compreendidos entre 5,5 e 6,8 sendo necessário o ajuste em 7,0 antes da alimentação. Esse valor baixo de pH pode estar relacionado com o pH do glicerol (5,18), e também ao acúmulo de ácidos voláteis durante o processo. Esse acúmulo pode estar relacionado a um excesso de carga orgânica no processo, pois, quando da decomposição do substrato haverá um excesso de produção de H<sub>2</sub> no sistema, o que desfavorecerá a reoxidação da coenzima necessária à continuidade do processo de degradação da matéria orgânica (NAD<sup>+</sup>). E, mais importante, no caso de excesso de formação de H<sub>2</sub>, não será favorável a conversão de outros ácidos orgânicos a acetato (único substrato na metanogênese), causando assim um acúmulo desses ácidos no meio. Outro fator que favorece esse acúmulo é que, devido aos rendimentos energéticos das reações termodinâmicas, a taxa de crescimento dos micro-organismos formadores desses ácidos (acidogênicos) é maior que as taxas de crescimento dos micro-organismos das etapas seguintes (acetogênese e metanogênese) (AQUINO, CHERNICHARO; 2005). No caso dos ensaios E3, E4 e E7, as concentrações totais de alimentação foram baixas para que o sistema admitisse a adição de glicerol, uma vez que a decomposição deste no processo anaeróbio é responsável pela produção direta desses ácidos orgânicos. Assim, antes de cada alimentação nos ensaios E3, E4 e E7 o pH da alimentação foi corrigido para pH 7,0. Para os ensaios E4 e E7 ainda, outro fator responsável pelo acúmulo de ácidos voláteis e abaixamento do pH do meio, foi a mínima concentração (1 g.L<sup>-1</sup>) e nenhuma concentração de *Spirulina* utilizada. Isso porque a decomposição das proteínas presentes na biomassa da microalga gera NH<sub>3</sub>, a qual, devido o equilíbrio químico em meio líquido (NH<sub>3</sub> + H<sup>+</sup> ↔ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), também tem influência sobre a alcalinidade do sistema, e assim, maior segurança para possíveis aumentos na concentração íons H<sup>+</sup> sem alterar o pH do meio. Tal fato pode ser observado ainda pelos mais baixos valores de alcalinidade e nitrogênio amoniacal encontrados nos ensaios E4 e E7 (Tabela 11). Hutnan et al. (2009) também precisaram adicionar solução tampão para aumentar o pH de 6,0 para 7,0 ao degradar glicerol utilizando reator em batelada. Segundo Holm-Nielsen et al. (2007) não haverá acúmulo de ácidos graxos voláteis quando da utilização de concentrações de glicerol inferiores a 5 g.L<sup>-1</sup>. Enquanto Athanasoulia; Melidis; Aivasidis (2014) relatam que quando a

concentração de glicerol é aumentada para 4 g.L<sup>-1</sup>, há tendências a aumento na concentração de ácidos graxos voláteis durante o processo de digestão anaeróbia.

**Tabela 11** pH, alcalinidade e nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub>) nos diferentes ensaios

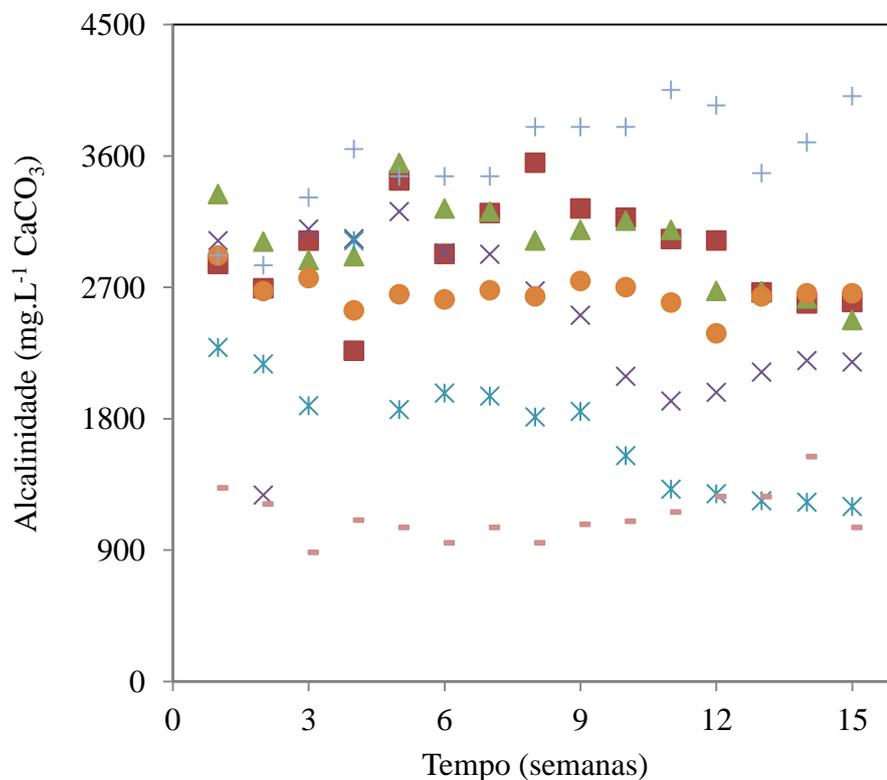
Ensaio	pH	Alcalinidade (mL.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	Nitrogênio Amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )
E1(10Sp)	7,2 ± 0,14 <sup>a</sup>	2951,82 ± 347,64 <sup>a,b</sup>	1030,34 ± 141,04 <sup>a</sup>
E2(10Sp +5G)	7,1 ± 0,12 <sup>a</sup>	2997,85 ± 294,70 <sup>a,b</sup>	1026,88 ± 151,25 <sup>a</sup>
E3(5Sp +5G)	7,0 ± 0,53 <sup>a</sup>	2479,10 ± 562,45 <sup>b,c</sup>	499,09 ± 70,68 <sup>b</sup>
E4(1Sp +5G)	7,0 ± 0,17 <sup>a</sup>	1775,58 ± 499,51 <sup>c,d</sup>	85,54 ± 16,43 <sup>c</sup>
E5(10Sp +10G)	7,1 ± 0,04 <sup>a</sup>	2657,27 ± 114,30 <sup>a,b,c</sup>	985,26 ± 139,65 <sup>a</sup>
E6(15Sp +5G)	7,3 ± 0,06 <sup>a</sup>	3578,98 ± 357,89 <sup>a</sup>	1100,99 ± 282,87 <sup>a</sup>
E7(5G)	7,0 ± 0,12 <sup>a</sup>	1133,37 ± 168,82 <sup>d</sup>	62,02 ± 12,62 <sup>c</sup>

Letras iguais dentro de cada coluna referem-se a médias estatisticamente iguais (p > 0,05).

Embora a medida do pH seja uma importante informação sobre o estado do processo, a alcalinidade é uma segurança a possíveis desequilíbrios na sequência de reações da digestão anaeróbia, uma vez que o acúmulo de ácidos voláteis causa um decréscimo na alcalinidade antes de alterar o pH (ANDRADE, 2009). A alcalinidade entre 2500 e 5000 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> é desejável para o processo de digestão anaeróbia (SOUZA, 1984); porém, se o processo for operado sem o acúmulo de ácidos orgânicos, é possível trabalhar com valores entre 500 a 1000 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> (SOARES, ZAIAT, 2007). De um modo geral, verifica-se que os ensaios que incluem maior fração de biomassa de *Spirulina* na composição da alimentação são os ensaios que apresentam maior alcalinidade, enquanto os ensaios que apresentavam a mais baixa ou nenhuma concentração da microalga apresentaram os valores mais baixos de alcalinidade (E4 e E7) (Tabela 11). A variação da alcalinidade ao longo do tempo para cada um dos ensaios é apresentada na Figura 7. Dentre todos, percebe-se que o ensaio E6 foi o único que apresentou tendência de aumento nos valores de alcalinidade

durante os ensaios. Neste, a condição de alimentação utilizada era de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa de *Spirulina*, a maior concentração de microalga dentre todos os ensaios. Quando comparado ao Ensaio E2 (Tabela 11), o qual faz uso da mesma razão C/N na alimentação (6,8), embora não haja diferença estatística significativa, nota-se que a tendência ao aumento nos valores de alcalinidade do sistema está diretamente relacionada com a concentração de biomassa microalgal utilizada.

**Figura 7** Alcalinidade nos ensaios com alimentação de: E1 (■), E2 (▲), E3 (×), E4 (\*), E5 (●), E6 (+) e E7 (-)

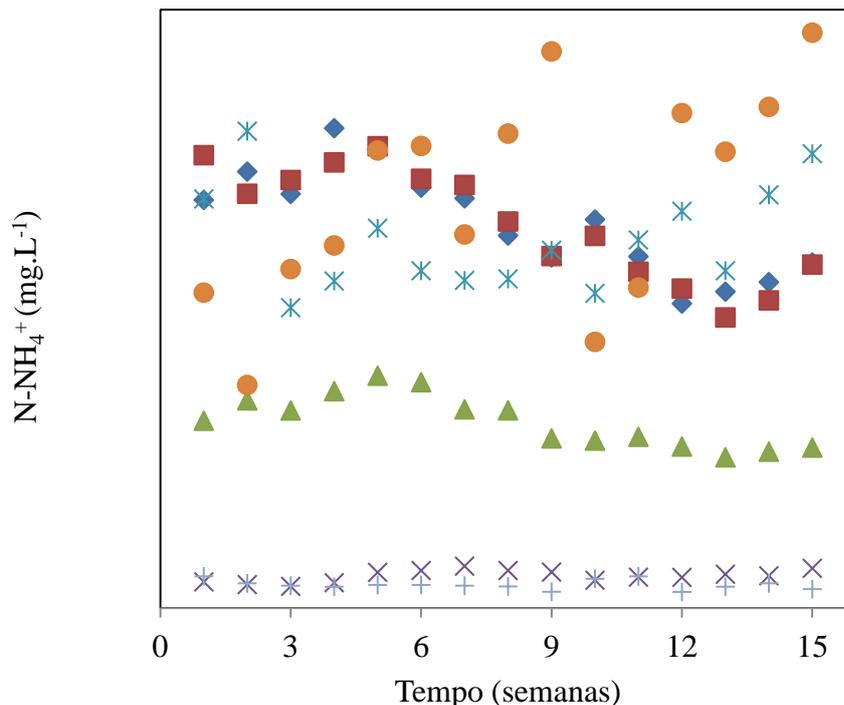


Além de ser resultante do equilíbrio químico do carbono inorgânico dissolvido a alcalinidade é resultante também da degradação de proteínas e seu aumento é proporcional à quantidade de amônia liberada (SIALVE et al., 2009). A combinação dos valores de pH e alcalinidade nos ensaios indica que a biomassa de *Spirulina* e glicerol proporcionam condições favoráveis para as bactérias participantes de todas as etapas envolvidas na produção de biogás. Para a concentração de nitrogênio amoniacal, os mais baixos valores foram encontrados para os ensaios com as mais baixas ou nenhuma concentração de *Spirulina* na alimentação (E3; E4 e E7), pois é a partir da decomposição de proteínas que haverá a

produção de  $\text{NH}_3$ . A Figura 8 apresenta a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) para os diferentes ensaios. Os ensaios E1, E2 e E5, que contêm  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa de *Spirulina* na alimentação apresentaram as maiores concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) nas primeiras semanas de experimento, e a partir da sexta semana, o ensaio E6, passou a ser o ensaio com maior concentração de nitrogênio amoniacal até o final dos experimentos. Embora a razão C/N neste em tal ensaio (E6) não seja a mais baixa utilizada, a concentração de *Spirulina* alimentada foi a maior dentre os experimentos ( $15 \text{ g.L}^{-1}$  de *Spirulina*). A amônia é produzida na degradação anaeróbia de proteínas e pode ser um problema na digestão anaeróbia, devido ao efeito inibitório do nitrogênio amoniacal, principalmente quando são utilizados substratos com alto teor proteico (SIALVE et al., 2009). No entanto, no presente estudo, embora a biomassa de *Spirulina* apresente alta concentração de proteínas, os valores de concentração de nitrogênio amoniacal estiveram dentro de faixas seguras ao desenvolvimento do processo, uma vez que sua toxicidade é relatada em concentrações de  $3000$  a  $4000 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ , a qual está relacionada ao pH do meio (ANGELIDAKI, AHRING, 1993), visto que a espécie química do equilíbrio que apresenta toxicidade é a  $\text{NH}_3$ , e esta é predominante no equilíbrio químico  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$  a partir de valores de pH de  $9,25$  (METCALF, EDDY, 2003).

**Figura 8** Concentração de nitrogênio amoniacal nos ensaios com alimentação de:

E1 (◆), E2 (■), E3 (▲), E4 (×), E5 (✱), E6 (●) e E7(+)



Na Tabela 12 é apresentado o conteúdo de carbono alimentado diariamente em cada ensaio, as espécies químicas em que o carbono se transforma no bioprocessamento anaeróbico e as conversões do carbono em  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  resultantes dessas transformações. As maiores conversões de carbono da alimentação em  $\text{CH}_4$  foram obtidas nos ensaios com a maior proporção de glicerol em relação à concentração total de alimentação (E3, E4 e E7) ( $0,46 \text{ g.g}^{-1}$ ;  $0,79 \text{ g.g}^{-1}$  e  $1,41 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente) (Tabela 12). Nos demais ensaios com adição de glicerol à alimentação (E2, E5 e E6), a conversão de carbono a  $\text{CH}_4$  também é incrementada quando comparada ao ensaio com alimentação apenas de *Spirulina* (E1). Como a decomposição do glicerol no processo anaeróbico resulta na formação de acetato ou outros ácidos orgânicos voláteis (passíveis de conversão a acetato em seguida), e como o acetato é diretamente convertido a  $\text{CH}_4$  pelas bactérias metanogênicas acetoclásticas, e visto que esta conversão é a responsável por mais de 70% (v/v) do  $\text{CH}_4$  produzido (MEGONIGAL et al., 2003), a maior proporção de glicerol na alimentação resulta em maiores conversões a  $\text{CH}_4$  no processo, mesmo com os mais baixos valores de carbono entrando no processo. Em contrapartida, quando a alimentação consta de somente biomassa de *Spirulina*, ou quanto maior a proporção desta na alimentação (e menor a de glicerol), mesmo que a massa total de carbono alimentada diariamente seja maior, a conversão a  $\text{CH}_4$  no processo decai, e aumenta a conversão do carbono alimentado a  $\text{HCO}_3^-$  dissolvido no efluente e a  $\text{CO}_2$  presente no biogás. Isso ocorre devido à complexidade da biomassa de *Spirulina*, com matéria orgânica composta por lipídios, carboidratos e, em sua maioria, proteínas. Já a maior conversão do carbono da alimentação em carbono do  $\text{CO}_2$  foi no ensaio E1 alimentado somente com biomassa de *Spirulina*.

**Tabela 12** Formas e conversões do carbono na produção de biometano a partir da biomassa de *Spirulina* e glicerol

Ensaio	C/N	C <sub>alim</sub> (g. d <sup>-1</sup> )	C <sub>effluente</sub> (g. d <sup>-1</sup> )	Y <sub>CCH4/Calim</sub> (g. g <sup>-1</sup> )	Y <sub>CCO2/Calim</sub> (g. g <sup>-1</sup> )
E1(10Sp)	4,9	0,58	0,10	0,03	0,69
E2(10Sp+5G)	6,7	0,58	0,10	0,25	0,03
E3(5Sp +5G)	9,3	0,31	0,09	0,46	0,01
E4(1Sp +5G)	23,7	0,15	0,05	0,79	0,02
E5(10Sp +10G)	8,7	1,04	0,10	0,14	0,03
E6(15Sp +5G)	6,1	1,34	0,13	0,13	0,02
E7(5G)	3,2×10 <sup>3</sup>	0,09	0,04	1,41	0,02

## 8 CONCLUSÃO

O glicerol bruto pode ser utilizado como substrato na co-digestão anaeróbia em conjunto com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Em todos os ensaios os valores médios de alcalinidade do efluente, com e sem a adição de glicerol e nitrogênio amoniacal se mantiveram dentro da faixa adequada para o processo anaeróbio, com alcalinidade variando entre 1133,37 e 3578,98 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> e nitrogênio amoniacal de 62,02 a 1100,99 mg.L<sup>-1</sup>. O pH variou de 7,0 a 7,3. Com os valores de pH e alcalinidade nos ensaios podemos concluir que a combinação de biomassa de *Spirulina* e glicerol proporcionou condições favoráveis para as bactérias participantes de todas as etapas envolvidas na produção de biogás. Em todos os ensaios com adição de glicerol houve incremento na produção de biogás (0,16 – 0,24 L.d<sup>-1</sup>) quando comparado ao ensaio em que somente a biomassa microalgal era alimentada no processo (0,05 L.d<sup>-1</sup>) ou quando somente glicerol era alimentado no processo (0,15 L.d<sup>-1</sup>). Razão C/N de 8,7 e 6,1, e concentração de alimentação de 20 g.L<sup>-1</sup> para ambos os ensaios, apresentaram as maiores produções específicas de biogás; valores de razão C/N semelhantes (de 6,7 e 9,3) resultaram em decréscimo nos valores de produção específica de biogás, o que ocorreu devido à menor concentração de alimentação utilizada (15 e 10 g.L<sup>-1</sup>). A proporção de cada substrato na alimentação de biorreatores anaeróbios é um parâmetro operacional de grande importância, uma vez que os substratos têm procedências e composições diferentes e apresentam, em função disso, diferentes biodegradabilidades. Nos ensaios com presença de glicerol na alimentação, os valores de conversão dos sólidos voláteis em biometano apresentou tendência a aumentar sendo que aquele alimentado somente com glicerol apresentou os maiores valores de conversão da matéria orgânica em biocombustível 1,70 L.g<sup>-1</sup>, demonstrando que co-digestão anaeróbia de glicerol e *Spirulina* é uma alternativa interessante para a produção de biocombustível e concomitante agregação de valor a uma matéria-prima residual que, para descarte ou outras aplicações necessitaria de purificação.

## **9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Avaliar o uso de glicerol como substrato para produção de biohidrogênio (visando geração de energia) e síntese de ácidos orgânicos a partir de digestão anaeróbia.
- Acompanhar, durante o experimento, os níveis de ácidos graxos voláteis, entre eles, o propionato, pois é um indicador da atividade metabólica.
- Determinar atividade metanogênica do inóculo.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, R.; LIDÉN, G. Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. **Renewable Energy**, v.33, n. 4, p. 726-734, 2008.

ANDRADE, M. R. **Biosistema para produção de Biomassa Microalgal e Biometano**, 2009, 184f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)- Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

AMON, T.; AMON, B.; KRYVORUCHKO, V.; BODIROZA, V.; PÖTSCH, E.; ZOLIITSCH, W. Optimizing methane yield from anaerobic digestion of manure: Effect of dairy system and of glycerin supplementation. **International Congress Series**. v. 1293, p. 217-220, 2006.

AMON, T., KRYVORUCHKO, V., AMON, B., SCHREINER, M. **Untersuchungen zur Wirkung von Rohglycerin aus der Biodieselerzeugung als leistungssteigerndes Zusatzmittel zur Biogaserzeugung aus Silomais, Körnermais, Rapspresskuchen und Schweinegülle**. SEEG: Mureck, Austria, 2004.

AOAC - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th ed. HORWITZ, W.;ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

APHA - **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19<sup>th</sup> ed., CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. eds. Washington: American PublicHealth Association, 1998.

APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGREVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755-781, 2008.

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 e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

ASTALS, S.; NOLLA-ARDÈVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: biogas and digestate. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 63–70, 2012.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P., AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 62, p. 73-78, 2014.

AZEVEDO, F. G. **Estudo das condições ambientais para produção de Biogás a partir de glicerol co-produto do Biodiesel**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Pernambuco – Campus de Recife – PE – Área de Concentração Engenharia Química, Recife, PE.

BABA, Y.; TADA, C.; WATANABE, R.; FUKUDA, Y.; CHIDA, N.; NAKAI, Y. Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 342–348, 2013.

BACKES, G. M. **Avaliação do processo de digestão anaeróbia na geração de energia a partir de dejetos suínos e bovinos de leite com suplementação de glicerina residual bruta oriunda da produção de biodiesel**, 2011. Dissertação de Mestrado, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS.

BENEMANN, J. R. CO<sub>2</sub> Mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion Management**, v. 38, p.475-479, 1997.

BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 97-289, 1999.

Brasil. Instituto Carbono Brasil. Disponível em:

[http://www.institutocarbonobrasil.org.br/mudancas\\_climaticas/gases\\_do\\_efeito\\_estufa](http://www.institutocarbonobrasil.org.br/mudancas_climaticas/gases_do_efeito_estufa).

Acesso em 25 de novembro 2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

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.

BRISSON, D.; VOHL, M. C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes. **BioEssays**, v. 23, p. 534-542, 2001.

BRUHN, A.; DAHL, J.; NIELSEN, H. B.; NIKOLAISEN, L.; RASMUSSEN, M. R.; MARKAGER, S.; OLESEN, B.; ARIAS, C.; JENSEN, P. D. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2595–2604, 2011.

BURKE, D. A. Dairy Waste Anaerobic Digestion Handbook. **Environmental Energy Company**, 6007 Hill Olympia, WA 98516, p. 17-27, 2001.

CARMONA, M.; VALVERDE, J. L.; PEREZ, A.; WARCHOL, J.; RODRIGUEZ, J. F. Purification of glycerol/water solutions from biodiesel synthesis by ion exchange: sodium removal Part I. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 738-744, 2009.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 503-526, 1985.

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

CHERNICHARO, C, A, L. **Reatores anaeróbios. Série: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 5ª Ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária – UFMG, v. 5, p. 245, 1997.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. IN: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 566, 2004.

COHEN, Z. The Chemicals of Spirulina In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* **Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S.; TORRES, B. R.; LODI, A.; ZILLI, M. Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5771-5776, 2009.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. **Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis***. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul: Editora da UCS, 2011. 1 CD-ROM.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General** v.281, p. 225-231, 2005.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from waste and renewable sources: a introduction**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 821-829, 2006.

EL-MASHAD, H. M. Kinetics of methane production from the co-digestion of switchgrass and *Spirulina platensis* algae. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 305-312, 2013

EUROPEAN COMMISSION. **Renewable make the difference**. EUROPEAN COMMISSION, 2011. Disponível em:

[http://ec.europa.eu/energy/publications/doc/2011\\_renewable\\_difference\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/energy/publications/doc/2011_renewable_difference_en.pdf) Acesso em: 29 de janeiro 2014.

EROGLU, E.; MELIS, A. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. Showa. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2359-2366, 2010.

FALQUET, J. **The nutritional aspects of *Spirulina*** - **Antenna Technology**, 1997.

Disponível em: <http://www.antenna.ch>. Acesso em: 10 de novembro 2012.

FOLCH J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p.497-509, 1957.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; HAANDEI, A. V.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. Fundamentos do Tratamento Anaeróbio. In.: CAMPOS, J.R (Coord). **Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada do Solo**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rima artes e textos, p. 29-52, 1999.

FOUNTOULAKIS, M. S.; PETOUSHI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1849-1853, 2010.

FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. **Bioresource Technology**, v.100, n.12, p. 3043-7, 2009.

FOX, R.D. *Spirulina* production & potencial. **Aix-em-Provence**: Edisud, p. 89, 1996.

FRANK, T, D. **Produção de biogás a partir de algas**, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

FURLAN, V. J. M.; MARGARITES, A. C. F.; MOREIRA, J. B.; SCHMIDT, V. W., COSTA, J. A. V. **Quantificação de carboidratos em microalgas** In: XX III Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia (Cricte), 2009, Joinville/SC.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 13- 28, 2008.

GASPAR, R. M. A. B. L. **Utilização de biodigestores em pequenas e médias propriedades rurais com ênfase na agregação de valor: um estudo de caso na região de Toledo-PR**, 2003, 119p. Dissertação (Engenharia de Produção) – UFSC

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic digestion of algae. **Applied Microbiology**, p. 47-55, 1957.

GUNASEELAN, V. N. Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, p. 83–114, 1997.

HAZIMAH, A. H.; OOI, T. L.; SALMIAH, A. Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. **Journal of Oil Palm Research**, v. 15, n.1, p. 1-5, 2003.

HENRARD, A, S, A. **Produção e purificação de biogás utilizando microalga *Spirulina* sp. LEB-18**, 2013. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* superalimento del futuro**. Ediciones Urano, 1994.

HO, S.-H., CHEN, C.-Y., LEE, D.-J., CHANG, J.-S., Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems - a review. **Biotechnol. Advances**, v. 29, n. 2, p. 189–198, 2010.

HOLM-NIELSEN, J. B.; LOMBORG, C. J.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; ESBENSEN, K. H. Online near infrared monitoring of glycerol-boosted anaerobic digestion processes: evaluation of process analytical technologies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, p. 302-313, 2007.

HOLST, B.; LUNDE, C.; LAGES, F.; OLIVEIRA, R.; LUCAS, C. GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multi-membrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.37, n. 1, p. 108-124, 2000.

HULSHOFF, P. L. W.; LENS, P. N.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of sulphate rich wastewaters. **Biodegradation**, v.9, p. 213-224, 1998.

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.

IGONI, A. H.; AYOTAMUNO, M. J.; EZE, C. L.; OGAJI, S. O. T.; PROBERT, S. D. Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 85, n. 6, p. 430-438, 2008.

IWR. **Instituto de Energia Renovável da Alemanha**. Disponível em: <http://iwr.de>. Acesso em 27 de novembro 2013.

JIANG, Y., ZHANG, W., WANG, W., CHEN, Y., SHEN, S., LIU, T., Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 359–364, 2013.

JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. A comparative Kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* batch reactors. **Biochemical Engineering Journal**. v.18, p. 121 – 132, 2004.

KOA, C. Y., CHIU, S. Y., HUANG, T. T., DAI, L., WANG, G. H., TSENG, C. P., CHEN, C. H., LIN, C. S. A mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. For the carbon dioxide capture from biogas. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 132-140, 2012.

LABATUT, R.; ANGENENT, L. T.; SCOTT, N. R. Biochemical methane potencial and biodegradability of complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2255-2264, 2011.

LARSEN, A. C. **Co-digestão anaeróbia de glicerina bruta e efluente de fecularia**, 2009, 41f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, 2009.

LETTINGA, G.; HULSHOF, P. L. W.; ZEEMAN, G. **Biological wastewater treatment**. Part I: Anaerobic wastewater treatment. Lectures notes. Wageningen, The Netherlands: Wagenengen University, 1999.

LI, Y.; STEPHEN, Y.; PARK, J. Z.; Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 821–826, 2011.

LEÓN, I. A. A. **Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**, 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP, 2010.

LOURENÇO, O. S.; BARBARINO, E.; LAVÍN, L. P.; MARQUEZ, L. M. U.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17-32, 2004.

LOURENÇO, O. S.; BARBARINO, E.; MARQUEZ, L. M. U.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 5, p. 798-811, 1998.

MA, J.; VAN, W. M.; CARBALLA, M.; VERSTRAETE, W. Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by co-digestion with glycerol. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 5 p.861-867, 2008.

MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; MACÉ, S.; ASTALS, S. Codigestion of solid: A review of its uses and perspectives including modeling. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 99-111, 2011.

MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S.; LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p. 3-16, 2000.

MEGONIGAL, J. P.; HINES, M. E.; VISSCHER, P. T. Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. In: Treatise on Geochemistry, v. 8 – **Biogeochemistry**, p. 317–424, 2003.

MENES, R. J. **Microbiología, Ecología y Bioquímica**. In: SCHMIDELL, W. et al. Tratamento biológico de águas residuais. Florianópolis: Paper Print, 2007.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Wastewater Engineering: treatment, disposal and reuse**, 4a ed. New York: McGraw Hill, p. 1819, 2003.

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

MIGLIORE, G.; ALISI, C.; SPROCATI, A. R.; MASSI, E.; CICCOLI, R.; LENZI, M.; WANG, A.; CREMISINI, C. Anaerobic digestion of macroalgal biomass and sediments sourced from the Orbetello lagoon, Italy. **Biomass and Bioenergy**, v. 42, p. 69-77, 2012.

MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. Central pathways of carbohydrate metabolism, **Microbial Physiology**, p.350-367, 2002.

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

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1038-1042, 2008.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.63, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007.

MOTA, CLAUDIO J. A., SILVA, CAROLINA X. A. DA AND GONÇALVES, VALTER L. C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 639 – 648, 2009.

NESSLER, J. A. Colorimetric determination of ammonia by Nessler reagent. **Chemisches Zentralblatt**, v. 27, p. 529-541, 1856.

NOYOLA, A.; SAGASTUME, J. M. M.; HERNANDEZ, J. E. L. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 5, p. 93–114, 2006.

OHSE, S.; DERNER, B. R.; OZÓRIO, A. R.; BRAGA, C. V. M.; CUNHA, P.; LAMARCA, P. C.; SANTOS, E. M. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1760-1767, 2009.

OLGUÍN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.

OOI, K.T.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue. A rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v.53, p.29-33, 2004.

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

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMSAY, I. R.; PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. **Biodegradation**, v. 12, p. 247-257, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2001.

RITTMANN, B.E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 203–212, 2008.

ROBRA, S., SERPADA, R. C., OLIVEIRA A. M., ALMEIDA NETO, J. A., SANTOS, J. V. Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 9, p. 1330-1335, 2010.

RYWINSKA, A.; RYMOWICZ, W.; ZAROWSKA, B.; WOJTATOWICZ, M. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1-6, 2009.

SALERNO, M., NURDOGAN, Y., LUNDQUIST, T.J. Biogas production from algae biomass harvested at wastewater treatment ponds, Proceedings of the ASABE **Bioenergy Engineering Conference**. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SALMINEN, E.; RINTALA, J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 13-26, 2002.

SARAVANAN, A.; BRINDHA, V.; MANIMEKALAI, R.; KRISHNAN, S. An evaluation of chromium and zinc biosorption by a sea weed (*Sargassum* sp.) under optimized conditions. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 53-56, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**, v. 2, p. 535. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

- SCHULLER, H. J. Transcriptional control of non fermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 43, n. 3, p. 60-139, 2003.
- SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 409-416, 2009.
- SILES LÓPEZ, J. A.; MARTIN SANTOS, M. D. L. A.; CHICA PÉREZ, A. F.; MARTÍN MARTIN, A. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5609-5615, 2009.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.
- SOARES, H. M.; ZAIAT, M. **Sistemas de Tratamento**. In: SCHMIDELL, W. et al. Tratamento biológico de águas residuais. Florianópolis: Paper Print, 2007.
- SOSNOWSKI, P. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. **Advances in Environmental Research**, v. 7, n. 3, p.609-616, 2003.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n. 2 p.87–96, 2006.
- SOUZA, M. E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. **Revista DAE**, v. 44, p. 88-94, 1984.
- STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; KING, Z.; MUSSGUG, J. H.; KRUSE, O.; POSTEN, C.; BOROWITZKA, M. A.; HANKAMER, B. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 126–128, 2010.
- STRIUGAS, N. **Investigation Of Hydrogen Rich Gas Production By Thermal Glycerol Fraction Decomposition**, 2009. Tese Kaunas University Of Technology Lithuanian Energy Institute , Kaunas.
- TAKAHASHI, T. The fate of industrial carbon dioxide. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 352-353, 2004.

TEFERA, G. *Spirulina*: The Magic Food. **Biodiversity Newsletter**, 2009. Disponível em: [http://www.ibt-et.org/Newsletter/tiki-read\\_article.php?articleId=12](http://www.ibt-et.org/Newsletter/tiki-read_article.php?articleId=12). Acesso em: 10 de novembro 2012.

THOMPSON, J. C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering and Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.

TICM, **Spanish Ministry of Tourism, Trade and Industry**. Spanish Royal Decree R. D. 661/2007, de 25 de Mayo, por El que se regula La actividad de producción de energia eléctrica régimen especial (in Spanish). BOE 126, 22846-22886, 2007.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.

XU, R.; MI, Y. Simplifying the process of microalgal biodiesel production through in situ transesterification technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 1, p. 91-99, 2011.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, 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, p. 130-134, 2007.

YONG, K. C.; OOI, T. L.; DZULKEFLY, K.; WANYUNUS, W. M. Z.; HAZIMAH, A. H. Characterization of glycerol residue from a palm kernel oil methyl Ester plant. **Journal of Oil Palm Research**, v. 13, n. 2, p. 1-6, 2001.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. Anaerobic Sewage Treatment. A Practical Guide for Regions with a Hot Climate. **John Wiley and Sons**, New York. p. 226, 1994.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**, 2011. Dissertação de Mestrado Área de concentração em Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.

VOEGELE, R. T.; SWEET, D. G.; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 1087-1094, 1993.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) **Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. Preface, p. IX-X. ISBN: 0-203-48396-0.

WEREKO-BROBBY, C. Y.; HAGEN, E.B. Biomass conversion and technology. **Energy Engineering**, John Wiley & Sons Ltd, England, p. 203, 2000.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris. 1966.

ZHONG, W.; ZHANG, Z.; LUO, Y.; QIAO, W.; XIAO, M.; ZHANG, M. Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 281-286, 2012.

## 11 ANEXOS

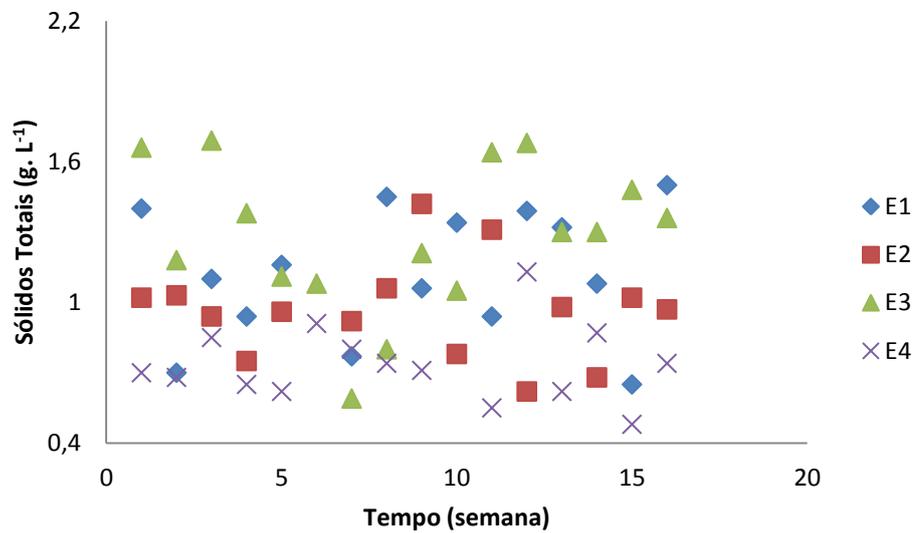
**Figura 9** “Sample bag” utilizada para coleta do gás



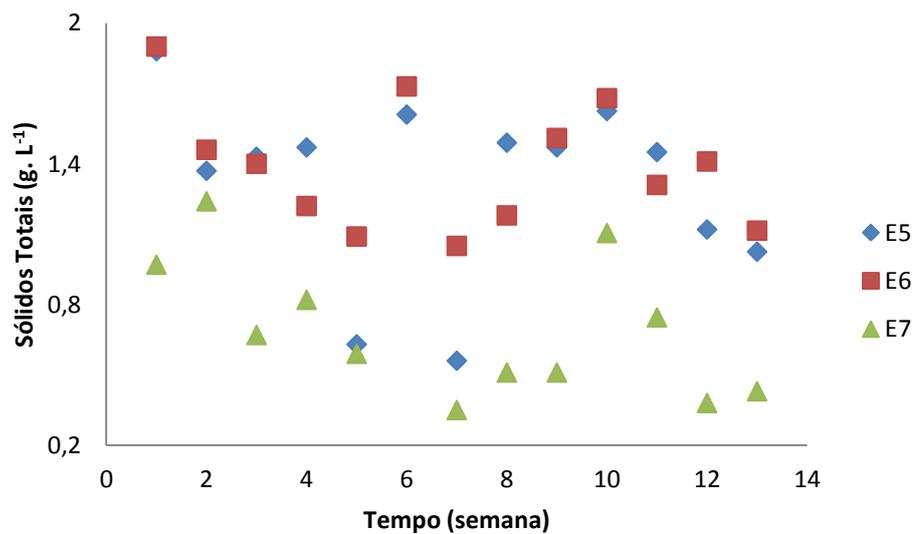
**Figura 10** Reatores anaeróbios de 2 L utilizados nos ensaios



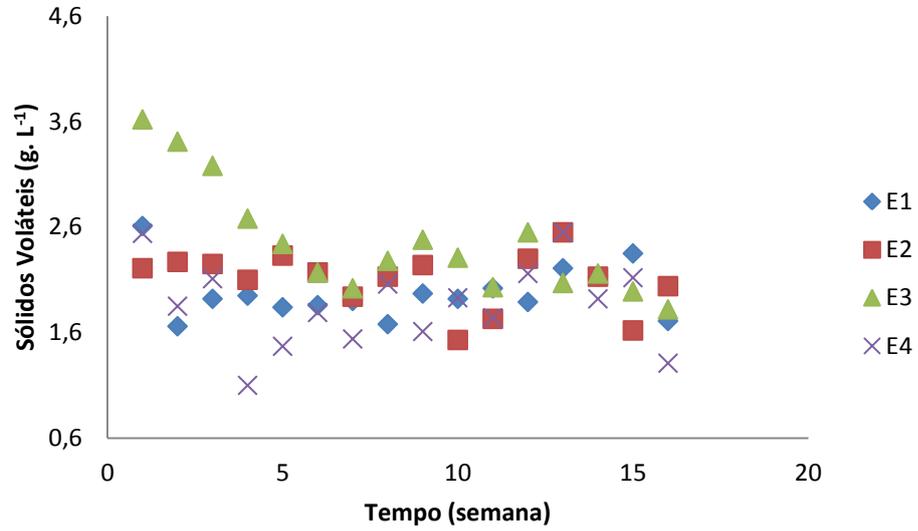
**Figura 11** Sólidos Totais nos ensaios com alimentação de: E1 (10Sp), E2 (10Sp +5G), E3 (5Sp +5G), E4 (1Sp +5G)



**Figura 12** Sólidos totais nos ensaios com alimentação de: E5 (10Sp+5G), E6 (15Sp+5G) e E7(5G)



**Figura 13** Sólidos voláteis nos ensaios com alimentação de: E1 (10Sp), E2 (10Sp+5G), E3 (5Sp+5G), E4 (1Sp+5G)



**Figura 14** Sólidos voláteis nos ensaios com alimentação de: E5 (10Sp+5G), E6 (15Sp+5G) e E7(5G)

