



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

EDILBERTO MARIANO DA SILVA

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL COM DIFERENTES
RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Recife
2022



**CARACTERIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DE RESERVATÓRIOS, ENERGIAS RENOVÁVEIS
E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL**

Apoio



Gestão



EDILBERTO MARIANO DA SILVA

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL COM DIFERENTES
RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Civil da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Civil.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite

Coorientadora: Prof. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Edilberto Mariano da .

Co-digestão anaeróbia de biomassa algal com diferentes resíduos orgânicos para otimização da produção de biogás / Edilberto Mariano da Silva. - Recife, 2022.

83 : il., tab.

Orientador(a): Wanderli Rogério Moreira Leite

Cooorientador(a): Maria de Lourdes Florencio dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Civil - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, apêndices.

1. microalgas. 2. co-digestão anaeróbia. 3. glicerina do biodiesel. 4. vinhaça de cana-de-açúcar. I. Leite, Wanderli Rogério Moreira. (Orientação). II. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos. (Coorientação). III. Título.

620 CDD (22.ed.)

EDILBERTO MARIANO DA SILVA

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL COM DIFERENTES
RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Civil da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Civil.

Aprovado em: 18/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos (Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Shyrlane Torres Soares Veras (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha família, pelo
apoio incondicional nos momentos
de turbulência e de felicidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ser minha fortaleza e me conceder inteligência emocional para que pudesse seguir em frente.

Aos meus pais, Leda e Antônio, pela educação, disciplina e todo esforço que sempre fizeram para me garantir melhores condições de vida e me incentivar no caminho que escolhi. Aos meus irmãos, Alícia, Leo e Diego, pelo companheirismo. Aos meus avós, por sempre estarem dispostos a me ajudar. Aos meus tios e tias, por toda preocupação comigo durante esses anos.

Aos meus mestres, que desde o primário até o ensino superior foram fundamentais na minha formação como ser humano e como futuro profissional.

Aos amigos que fiz durante a graduação, em especial João Victor, João Lucas, Bárbara, Igor, Brendow e Murilo, pela amizade e todo apoio.

Aos meus orientadores, Wanderli Leite e Lourdinha Florencio, pela oportunidade, pelos ensinamentos, incentivos e contribuição.

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

Aos amigos do LSA, especialmente Sayonara, Agnes, Luiz, Marília, Devson, Alynne, Acson, Gabriel, Dicla, Gisella, Francielle, Henrique, Elissandra, por todo auxílio que me deram durante os dias de experimentos.

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, por meio do Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP/FINEP, pelo apoio financeiro, suportado com recursos provenientes do investimento de empresas petrolíferas qualificadas da Cláusula de P, D&I da Resolução ANP nº 50/2015. Em particular ao PRH 48.1 “Caracterização e Simulação de Reservatórios, Energias renováveis e Biotecnologia Ambiental” (PROCESSO ANP Nº 48610.201019/2019-39), do Departamento de Energia Nuclear do Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

As microalgas são um substrato promissor para recuperação de energia através da produção de metano via digestão anaeróbia. Entretanto, a baixa relação carbono nitrogênio (C/N) é considerada um dos principais fatores limitantes da sua biodegradabilidade. Neste sentido, para melhorar a relação C/N, avaliou-se a utilização de glicerina residual da produção do biodiesel (G) e vinhaça de cana-de-açúcar (V) em co-digestão com microalgas (M) coletadas em lagoa de alta taxa, visando um aumento do rendimento de CH₄. Para tanto, foram realizados testes de potencial bioquímico de metano (PBM), delineados pelo planejamento de misturas centróide simplex. A co-digestão dos substratos proporcionou um aumento no rendimento de CH₄ de até 4,2 vezes (M:V:G de 16,7:16,7:66,7) o obtido na digestão individual de biomassa algal, que apresentou um PBM de $150,0 \pm 2,8 \text{ NmL CH}_4.\text{gSV}_{\text{ad}}^{-1}$. Todas as misturas avaliadas apresentaram efeitos sinérgicos, com aumentos de até 38% nos rendimentos quando comparados à produção teórica estimada, correspondendo à mistura entre biomassa algal e glicerina, em iguais proporções. Os testes de co-digestão também promoveram um aumento da biodegradabilidade e percentual de metano no biogás, apresentando valores máximos de $98,59 \pm 1,98\%$ e $71,1 \pm 0,6 \%$, respectivamente. Quatro modelos polinomiais foram ajustados aos dados de PBM e índice de sinergia, e comparados estatisticamente. A equação quadrática ($R'^2 = 0,9462$) foi utilizada para modelar os dados de PBM, enquanto a equação cúbica completa ($R'^2 = 0,7874$) foi escolhida para representar os dados de índice de sinergia. Utilizando as equações, foi previsto um valor máximo de PBM de $719,6 \text{ NmL CH}_4.\text{gSV}_{\text{ad}}^{-1}$, para ensaio contendo apenas glicerina, enquanto o índice de sinergia máximo estimado foi de 1,49 (aumento de 49% no rendimento de metano), para razão M:V:G de 50:0:50, em termos de sólidos voláteis. Foi realizado teste de atividade metanogênica específica para avaliar o lodo de inóculo quanto à atividade e produção de metano, obtendo-se valor máximo de $0,25 \text{ gDQO-CH}_4.\text{gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Os resultados demonstraram a viabilidade da co-digestão no tratamento dos substratos avaliados, com possibilidade do uso energético do metano produzido.

Palavras-chave: microalgas, co-digestão anaeróbia, glicerina do biodiesel, vinhaça de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Microalgae are a promising substrate for energy recovery through methane production via anaerobic digestion. However, the low carbon to nitrogen ratio (C/N) is considered one of the main limiting factors of its biodegradability. Therefore, to improve the C/N ratio, the use of residual glycerine from biodiesel production (G) and sugarcane vinasse (V) in co-digestion with microalgae collected in a high rate pond (M) was evaluated, aiming at an increase in the yield of CH₄. Therefore, biochemical methane potential (BMP) tests were performed, designed by simplex-centroid mixture design. Co-digestion of the substrates provided an increase in CH₄ yield of up to 4.2 times that obtained from individual digestion of algal biomass, which showed a BMP of $150.0 \pm 2.8 \text{ NmL CH}_4.\text{gVS}_{\text{ad}}^{-1}$. All the mixtures evaluated showed synergistic effects, with increases of up to 38% in yields when compared to the estimated theoretical production, corresponding to the mixture between algal biomass and glycerine, in equal proportions. The co-digestion tests also promoted an increase in biodegradability and percentage of methane in the biogas, showing maximum values of $98.59 \pm 1.98\%$ and $71.1 \pm 0.6 \%$, respectively. Four polynomial models were fitted to the BMP and synergy index, and compared statistically. The quadratic equation ($R'^2 = 0.9462$) was used to model the BMP data, while the full cubic equation ($R'^2 = 0.7874$) was chosen to represent the synergy index. Using the equations, a maximum value of $719.6 \text{ NmL CH}_4.\text{gVS}_{\text{ad}}^{-1}$ was predicted for BMP, for mixture containing glycerine only, while the maximum estimated synergy index was 1.49 (49% increase in methane yield), for reason M:V:G of 50:0:50, in terms of volatile solids. A specific methanogenic activity (SMA) test was performed to evaluate the sludge for methane activity and production, obtaining a maximum value of $0.25 \text{ gCOD-CH}_4.\text{gVS}^{-1}.\text{day}^{-1}$. The results demonstrated the feasibility of co-digestion in the treatment of the substrates evaluated, with the possibility of the energetic use of the methane produced.

Keywords: microalgae, anaerobic co-digestion, glycerine of biodiesel, sugarcane vinasse

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.....	23
Figura 2 – Coleta de biomassa algal: (a) lagoa de alta taxa. (b) concentração da biomassa algal utilizando peneira com abertura de 0,250 mm	37
Figura 3 – Purificação da glicerina residual: (a) separação de fases da amostra em funil de separação. (b) amostra de glicerina purificada	38
Figura 4 – Coleta da vinhaça: (a) usina de produção de açúcar e etanol (b) vinhaça de cana-de-açúcar.....	38
Figura 5 – Representação esquemática do aparato utilizado para os testes de PBM e AME..	41
Figura 6 – Reatores instalados na sala termostatizada do LSA.....	42
Figura 7 – Representação do planejamento de misturas de substratos (x_1 , x_2 e x_3) centróide simplex com adição de pontos internos.....	46
Figura 8 – Imagem microscópica da biomassa algal proveniente de lagoa de alta taxa. Magnitude: 100x.....	50
Figura 9 – Produção acumulada de metano para diferentes concentrações do lodo de cervejaria nos testes AME (média $\pm$ desvio padrão).....	52
Figura 10 – AME do lodo de cervejaria para diferentes concentrações da biomassa	53
Figura 11 – PBM acumulado para as diferentes misturas avaliadas (média $\pm$ desvio padrão).....	54
Figura 12 – Índice de sinergia em função da relação C/N das misturas.....	58
Figura 13 – Concentração de nitrogênio amoniacal inicial e final das misturas	59
Figura 14 – Concentração de sólidos totais e voláteis iniciais e finais das misturas (média $\pm$ desvio padrão)	60
Figura 15 – Concentração de DQO solúvel inicial e final das misturas (média $\pm$ desvio padrão)	61
Figura 16 – Correlação entre os valores de PBM previstos pela equação quadrática em função dos valores reais	64
Figura 17 – Distribuição dos resíduos em função dos valores de PBM estimados pela equação quadrática.....	64
Figura 18 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados dos componentes da equação quadrática obtida pelo PBM das misturas de biomassa algal, vinhaça e glicerina.....	65
Figura 19 – Gráficos de resposta para o y_{PBM} : (a) mapa de contorno. (b) superfície de resposta	66

Figura 20 – Correlação entre os valores do índice de sinergia pela equação cúbica completa em função dos valores reais.....	67
Figura 21 – Distribuição dos resíduos em função dos valores do índice de sinergia estimados pela equação cúbica completa	67
Figura 22 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados dos componentes da equação cúbica completa obtida pelo índice de sinergia das misturas de biomassa algal, vinhaça e glicerina.	68
Figura 23 – Gráficos de resposta para o índice de sinergia (y_{IS}): (a) mapa de contorno (b) superfície de resposta.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo da produção de metano com diferentes substratos utilizados na co-digestão anaeróbia com microalgas em reatores de batelada em escala de bancada	31
Tabela 2 – Caracterização do lodo utilizado como inóculo.....	36
Tabela 3 – Parâmetros construtivos da lagoa de alta taxa	37
Tabela 4 – Parâmetros e respectivos métodos analíticos utilizados na caracterização dos substratos e do inóculo.	39
Tabela 5 – Condições cromatográficas para análise de AGVs.....	39
Tabela 6 – Condições cromatográficas para análise da composição do biogás	43
Tabela 7 – Composição da solução de macro e micronutrientes.....	44
Tabela 8 – Matriz experimental do centróide simplex em termos de concentração inicial e volume de cada substrato.....	46
Tabela 9 – Resultados da caracterização da biomassa algal utilizada nos experimentos (média $\pm$ desvio padrão)	50
Tabela 10 – Resultados da caracterização da glicerina residual bruta (GB) e após purificação (GP) (média $\pm$ desvio padrão)	51
Tabela 11 – Resultados da caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos (média $\pm$ desvio padrão).....	51
Tabela 12 – Valores de atividade metanogênica específica e máxima tangente de produção para cinco concentrações de lodo	52
Tabela 13 – Relação C/N, PBM, percentual de metano no biogás, índice de sinergia e biodegradabilidade das misturas (média $\pm$ desvio padrão).....	54
Tabela 14 – pH (média $\pm$ desvio padrão), ácidos graxos voláteis e alcalinidade dos reatores	58
Tabela 15 – Valores da constante de hidrólise de primeira ordem obtido através da modelagem da produção de metano	61
Tabela 16 – Resumo dos parâmetros estatísticos dos modelos polinomiais otimizados para avaliação do potencial bioquímico de metano.....	62
Tabela 17 – ANOVA do ajuste pelos mínimos quadrados da equação quadrática para o potencial bioquímico de metano.....	63
Tabela 18 – Resumo dos parâmetros estatísticos dos modelos polinomiais otimizados para avaliação do índice de sinergia.....	66
Tabela 19 – ANOVA do ajuste pelos mínimos quadrados da equação cúbica completa para o índice de sinergia	67

Tabela 20 – Resultados otimizados do potencial bioquímico de metano e índice de sinergia através do planejamento centróide simplex..... 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Modelos polinomiais utilizados no presente trabalho	47
Quadro 2 – Análise de variância para o ajuste pelo método dos mínimos quadrados de um modelo linear nos parâmetros.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AME	Atividade Metanogênica Específica
ANOVA	Tabela de análise de variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APHA	Associação Americana de Saúde Pública
B11	Diesel com adição de 11% de biodiesel
BERSO	Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
C/N	Relação carbono-nitrogênio
$C_3H_5(OH)_3$	Glicerol
Ca^{2+}	Cálcio
CH_4	Gás metano
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
CO_2	Gás carbônico
COT	Carbono Orgânico Total
CTG	Centro de Tecnologia e Geociências
DA	Digestão Anaeróbia
DQOs	Demanda Química de Oxigênio solúvel
DQOt	Demanda Química de oxigênio total
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F_{fal}	Significância estatística da falta de ajuste
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
F_{Reg}	Significância estatística da regressão
GC-FID	Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama
GC-TCD	Cromatógrafo gasoso com detector de condutividade térmica
GEE	Gases de Efeito Estufa
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
H_2	Gás hidrogênio
H_2S	Gás sulfídrico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

I/S	Relação inóculo/substrato
IS	Índice de Sinergia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
k	Constante de hidrólise
KOH	Hidróxido de potássio
LAT	Lagoa de Alta Taxa
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
m/v	Relação massa/volume
Mg^{2+}	Magnésio
Na^{+}	Sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_3	Amônia
NH_4^{+}	Amônio
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
p	p-valor
P total	Fósforo total
PBM	Potencial Bioquímico de Metano
pH	Potencial hidrogeniônico
PRH	Programa de Formação de Recursos Humanos
R^2	Coefficiente de determinação
R'^2	Coefficiente de determinação ajustado
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
X_1 , X_2 e X_3	Proporções de cada substrato na mistura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Justificativa e motivação.....	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	Produção e utilização do biogás	21
3.2	Digestão anaeróbia	22
3.3	Digestão anaeróbia de biomassa algal	23
3.3.1	Microalgas e as lagoas de estabilização	25
3.3.2	Obstáculos da utilização de microalgas como substrato	26
3.3.3	Co-digestão anaeróbia de biomassa algal.....	29
3.3.3.1	<i>Glicerol</i>	32
3.3.3.2	<i>Vinhaça</i>	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Inóculo	36
4.2	Coleta dos substratos.....	37
4.3	Métodos analíticos	38
4.4	Biodegradabilidade anaeróbia	40
4.5	Índice de sinergia.....	40
4.6	Testes do potencial bioquímico de metano (PBM)	41
4.7	Testes de atividade metanogênica específica (AME).....	43
4.8	Cinética de hidrólise	45
4.9	Planejamento e análise das misturas	45
4.9.1	Ajuste de modelos polinomiais	46
4.9.2	Figuras de mérito.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Caracterização dos substratos.....	50
5.2	Avaliação do teste de atividade metanogênica específica do lodo.....	52
5.3	Testes do potencial bioquímico de metano.....	53
5.3.1	Avaliação da estabilidade dos testes	58
5.4	Planejamento de misturas centróide simplex	62

5.4.1	Ajuste dos modelos polinomiais para o PBM	62
5.4.2	Ajuste dos modelos polinomiais para o índice de sinergia	66
5.4.3	Otimização do potencial bioquímico de metano e do índice de sinergia	69
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	71
6.1	Conclusões.....	71
6.2	Sugestões para pesquisas futuras.....	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A – DADOS DE PRODUÇÃO ACUMULADA DE METANO	82

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por energia baseada em combustíveis fósseis, em decorrência do aumento da população mundial e desenvolvimento econômico, associada aos impactos ambientais negativos causados pela queima destes combustíveis, têm motivado cientistas do mundo inteiro a realizar pesquisas voltadas ao desenvolvimento de biocombustíveis sólidos, líquidos e gasosos, como recursos energéticos alternativos.

A busca por fontes alternativas e renováveis de energia tem incentivado a investigação da capacidade energética de diferentes substratos. Nesse cenário, as microalgas são consideradas uma fonte alternativa potencial para a produção de bioenergia, devido à sua alta eficiência fotossintética e maiores taxas de crescimento e produtividade em comparação com as culturas convencionais, além da possibilidade de cultivo em áreas de terra não arável, ou em lagos e no oceano. Por serem compostos basicamente de proteínas, lipídeos e carboidratos, estes seres microscópicos podem ser convertidos em biocombustíveis, tais como o biodiesel, biometano, bioetanol, biohidrogênio etc.

Sabe-se que dentre as diversas tecnologias de tratamento de esgotos, as lagoas de estabilização, em especial as lagoas de alta taxa (LAT), são unidades com grande produção de microalgas, tendo em vista a disponibilidade de água e dos nutrientes presentes nos esgotos domésticos, além da presença de dióxido de carbono (CO_2) e luz. Durante seus processos metabólicos, as microalgas assimilam os nutrientes e auxiliam na depuração do efluente. Embora essas lagoas apresentem boa eficiência na remoção de elementos indesejáveis, a elevada produtividade de biomassa algal ocasiona diversos problemas nos corpos receptores, tais como consumo de oxigênio, cor e turbidez.

Estudos têm buscado alternativas que possibilitem a obtenção de biocombustíveis a partir das microalgas cultivadas em lagoas de alta taxa, ao passo que os problemas citados sejam mitigados. Dentre as alternativas avaliadas, a digestão anaeróbia tem sido considerada uma das tecnologias mais apropriadas para maximizar a recuperação de recursos da biomassa algal produzida em efluentes. O uso da digestão anaeróbia possibilita a recuperação de nutrientes valiosos, redução de custos associados ao tratamento e descarte de resíduos de microalgas, além de reduzir significativamente o potencial poluidor. Por outro lado, o biogás pode ser utilizado para fornecimento de calor e eletricidade ou como combustível veicular após refino.

Apesar do elevado potencial atrativo como matéria prima para produção de biogás, a digestão anaeróbia de biomassa algal bruta apresenta limitações. As maiores complexidades são reportadas como sendo a baixa biodegradabilidade da parede celular, bem como a inibição do processo pela presença de amônia, normalmente associada à baixa relação carbono-nitrogênio (C/N), algo comum à maioria das espécies de microalgas.

Nesse cenário, o interesse científico aponta para a associação de diferentes substratos, com o objetivo de aumentar a recuperação energética, fazendo uso do processo de co-digestão anaeróbia. Essa união de substratos vem sendo considerada uma alternativa tecnológica interessante para superar as limitações da digestão anaeróbia com apenas um substrato, pois além de proporcionar a manutenção da relação C/N dentro do reator e possibilitar aumento da recuperação energética, ela também pode reduzir os custos do tratamento de vários resíduos.

Um substrato potencial que pode ser co-digerido com microalgas é a glicerina, um resíduo originado do processo de transesterificação de óleos vegetais e animais para produção de biodiesel. A glicerina residual é gerada em grandes quantidades, sendo considerada a produção de 10kg de glicerina, com 55-90% de glicerol, para cada 100kg de biodiesel produzido (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Em 2021, estima-se que cerca de 676000 toneladas de glicerina foram produzidas no país, um aumento de 183% com relação ao ano de 2010 (ANP, 2021). Com o constante crescimento da indústria de biodiesel, é gerado um excedente de glicerina que ocasiona problemas ambientais e econômicos associados à eliminação desse subproduto (SILES LÓPEZ *et al.*, 2009). Sendo assim, o processo de digestão anaeróbia torna-se uma alternativa atraente para destinação do excedente de glicerina residual gerado, em especial quando utilizada como co-substrato, convertendo-a em produto de valor agregado a preços reduzidos, tornando mais viável a produção de biodiesel (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

O aproveitamento da vinhaça de cana-de-açúcar para produção de biogás também vem ganhando destaque nos últimos anos. Este substrato compreende a principal corrente do processo de produção do etanol, sendo gerado especificamente na etapa de destilação a uma taxa média de 13 litros por litro de etanol produzido (XAVIER, 2007). Segundo dados da Associação Brasileira de Biogás (ABIOGÁS, 2018), o potencial de produção de biogás no Brasil é de 82 bilhões de metros cúbicos/ano, sendo o setor sucroenergético correspondente a 48% deste potencial. Dessa forma, ao invés de destinar a vinhaça bruta à fertirrigação, o emprego da digestão anaeróbia deste substrato tem alta potencialidade para produção de metano, além de reduzir o potencial poluidor e preservar nutrientes como potássio, nitrogênio

e fósforo, que permanecem no digestato após o processo de digestão da vinhaça, possibilitando ainda sua aplicação na fertirrigação dos canaviais (FUESS; GARCIA, 2014).

Diante desse cenário, a proposta deste trabalho foi avaliar a co-digestão anaeróbia de biomassa algal cultivada em lagoa de alta taxa, com glicerina residual de biodiesel e vinhaça de cana-de-açúcar, tendo em vista melhorar a biodegradabilidade das microalgas frente à baixa relação C/N que estas possuem. A avaliação da associação dos substratos foi realizada através de planejamento de misturas e determinou-se quais as proporções dos substratos que levam a uma maior recuperação de bioenergia.

1.1 Justificativa e motivação

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SNIS, em 2020, apenas 50,8% do total do esgoto gerado no Brasil era tratado (SNIS, 2021). Tendo em vista este cenário insustentável, o novo marco do saneamento estabelece metas de universalização para que 90% da população brasileira seja atendida com coleta e tratamento de esgotos até dezembro de 2033 (BRASIL, 2020). Dessa forma, existe uma perspectiva de crescimento do emprego de unidades de tratamento de esgotos, dentre elas as lagoas de estabilização, aumentando assim a produção de biomassa algal. Paralelo a isso, o crescimento das fontes alternativas de energia, tais como a utilização de biocombustíveis, também tem como consequência o aumento dos resíduos provenientes de seus processos produtivos, como é o caso da glicerina oriunda da produção do biodiesel e da vinhaça proveniente da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

A utilização da biomassa algal em co-digestão com glicerina e vinhaça para aumento da produção de biogás parece ser uma alternativa promissora para aproveitamento energético destes resíduos, visando contornar os principais problemas da digestão individual das microalgas. Além disso, não há relatos da utilização de microalgas em mistura ternária com estes substratos. Com isto, dentro de uma abordagem de biorrefinaria, são mitigadas emissões de metano proveniente da decomposição destes resíduos e, em virtude de seu aproveitamento energético, há uma maior possibilidade de reduzir os custos de destinação e contribuir efetivamente na oferta de energia por meio do biogás.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a produção de metano a partir da co-digestão anaeróbia de biomassa algal com glicerina residual do biodiesel e vinhaça de cana-de-açúcar.

2.2 Específicos

- Determinar o potencial de produção de metano a partir da co-digestão de biomassa algal com os co-substratos propostos, através de testes em batelada, delineados por planejamento de misturas;
- Avaliar parâmetros de estabilidade e desempenho do processo anaeróbio para as diferentes misturas;
- Verificar o efeito da relação C/N na produtividade de metano e biodegradabilidade dos substratos;
- Determinar as proporções de mistura dos substratos que maximizam o rendimento de metano e o efeito sinérgico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção e utilização do biogás

Dentre as fontes alternativas disponíveis no Brasil está o biogás, proveniente da biodigestão anaeróbia de matéria orgânica, como resíduos e efluentes industriais, urbanos e rurais, denominados de substratos. Esse gás possui cerca de 60% de metano em sua composição e, em virtude do elevado poder calorífico, permite a sua utilização na geração de calor e energia elétrica. Além disso, ao submeter o biogás a um processo de refino, é possível obter o biometano, que, segundo legislação vigente, pode ser considerado similar ao gás natural quando contiver mais de 90% de metano em sua composição, passível de ser utilizado para os mesmos fins que o combustível fóssil em questão (ANP, 2017).

Além do potencial energético, um dos grandes benefícios associados à produção do biogás refere-se ao seu importante papel no saneamento ambiental, uma vez que a digestão anaeróbia atua na correta destinação e tratamento de resíduos orgânicos, contribuindo para minimização dos impactos ambientais e redução da emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE). Outro benefício é a produção do digestato, efluente do processo, que possui propriedades fertilizantes para o solo.

Apesar de todos esses benefícios, o biogás ainda representa uma parcela pouco significativa da matriz energética brasileira. Em 2019, a participação do biogás na matriz energética era inferior a 1% (EPE, 2019). Por outro lado, o número de plantas em operação no país tem crescido substancialmente, passando de 653 plantas em 2020, para 755 plantas no ano de 2021, que produziram cerca de 2,3 bilhões Nm^3 de biogás, o que corresponde a 2,7% do potencial teórico de produção do país (CIBIOGÁS, 2022).

Em 2021, o setor agropecuário foi responsável por 80% das plantas em operação no país, seguido pelos setores industrial e de saneamento. Com relação ao ranking de produção de biogás entre os estados, Pernambuco ocupava a 6ª posição, contribuindo com 145 milhões de metros cúbicos por ano, proveniente de 6 plantas de biogás instaladas no setor de saneamento (CIBIOGÁS, 2022).

3.2 Digestão anaeróbia

O processo de digestão anaeróbia (DA) há muito vem se estabelecendo como uma biotecnologia amplamente utilizada para o gerenciamento de resíduos orgânicos, como biossólidos, resíduos agrícolas, esterco animal, culturas energéticas e resíduos de alimentos, fornecendo soluções sustentáveis para recuperação de energia renovável e produção de recursos de valor agregado (KIM *et al.*, 2022).

A digestão anaeróbia é um processo bioquímico complexo, multifásico e desenvolvido por diversos grupos de microrganismos na ausência de oxigênio. Pode ser considerado como um ecossistema onde diversos grupos microbianos trabalham interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de novas células bacterianas. Este processo ocorre basicamente em quatro estágios bioquímicos fundamentais, que incluem a hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (CHERNICHARO, 2016).

Na hidrólise, as bactérias hidrolíticas fermentativas mediam a degradação de compostos orgânicos complexos, ou seja, carboidratos, lipídeos e proteínas em compostos orgânicos simples e solúveis, como açúcares, ácidos graxos e aminoácidos. Na acidogênese, os produtos solúveis, oriundos da etapa de hidrólise, são metabolizados no interior das células das bactérias acidogênicas, e convertidos a ácidos orgânicos ou ácidos graxos voláteis (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol), cetonas (acetona), dióxido de carbono e hidrogênio (CHERNICHARO, 2016; YADAV *et al.*, 2022).

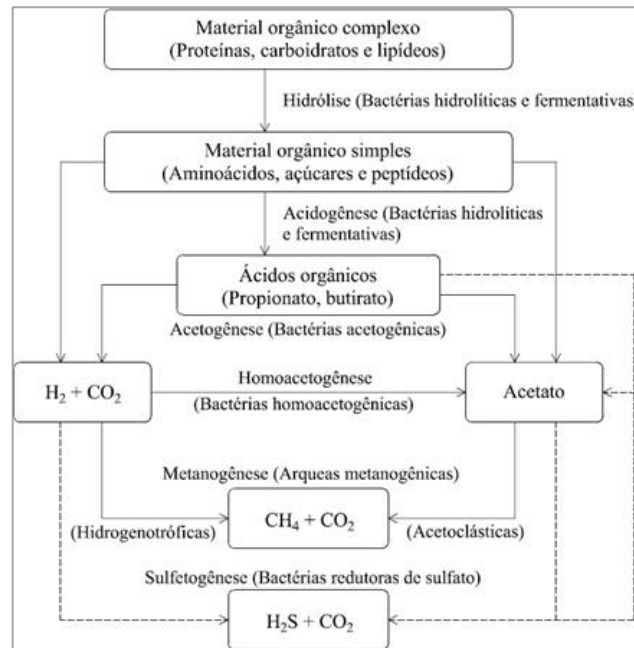
Na fase seguinte, a acetogênese, as bactérias sintróficas acetogênicas são responsáveis pela oxidação de compostos orgânicos intermediários, como propionato e butirato, em substrato apropriado para os microrganismos metanogênicos (acetato, hidrogênio e dióxido de carbono). Na fase final da DA ocorre a metanogênese, onde os compostos orgânicos são convertidos em metano e dióxido de carbono. A conversão de acetato é realizada pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas, as quais são responsáveis por cerca de 60 a 70% de toda a produção de metano, enquanto as hidrogenotróficas são responsáveis pela utilização de H_2 e CO_2 para produção de CH_4 (CHERNICHARO, 2016).

Em paralelo à metanogênese, quando o substrato a ser tratado apresenta elevadas concentrações de sulfato, parte da matéria orgânica pode ser removida via rota sulfetogênica. Esta via deve-se à ação das bactérias redutoras de sulfato (BRS), que utilizam o sulfato para

degradação de componentes orgânicos e hidrogênio, sendo o mesmo reduzido a sulfeto (TAKEDA, 2021).

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

Figura 1 – Rotas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de McCarty e Smith (1986).

O biogás gerado no processo de digestão anaeróbia consiste tipicamente em metano (60%), dióxido de carbono (40%), vapor de água e quantidades traço de sulfeto de hidrogênio (H_2S). É um gás inodoro e incolor, que arde com chama azul claro semelhante ao de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) (ALVES, 2016).

Vários fatores podem influenciar na digestão anaeróbia e na produção de biogás em digestores, tais como: pH, temperatura, umidade, natureza do substrato, teor de carbono e nitrogênio, inóculo, relação inóculo/substrato (I/S), configuração do digestor, carga orgânica aplicada e tempo de detenção hidráulica (TDH) (MERLIN CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014).

3.3 Digestão anaeróbia de biomassa algal

Com o aumento da população global e utilização contínua dos combustíveis fósseis, cujas fontes estão se esgotando, tem havido um aumento do interesse em fontes de energias renováveis baseadas na transformação de biomassa.

Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais claro que os biocombustíveis de primeira geração, como a produção de etanol a partir de açúcares vegetais ou a produção de biodiesel a partir de lipídeos vegetais, têm gerado uma grande pressão nos mercados mundiais de alimentos, além do grande impacto no consumo de água e destruição precoce das florestas mundiais (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUSSGNUG *et al.*, 2010). Adicionalmente, os biocombustíveis de segunda geração, oriundos de matérias primas de culturas não alimentares, biomassa lignocelulósica e resíduos florestais, apesar de não competirem pela produção de alimentos e áreas férteis, nunca serão abundantes o suficiente para atender toda a demanda por combustíveis do setor de transportes, por exemplo (AHMAD *et al.*, 2011).

Nesse cenário, as microalgas são consideradas uma fonte alternativa para a produção de bioenergia, sendo classificadas como a principal matéria prima fonte dos biocombustíveis de terceira geração, devido à sua alta eficiência fotossintética e maiores taxas de crescimento e produtividade em comparação com as culturas convencionais, além da possibilidade de cultivo em áreas de terra não arável, ou em lagos e no oceano (MINOWA *et al.*, 1995). Por serem compostas basicamente de proteínas, lipídeos e carboidratos, as microalgas podem ser convertidas em biodiesel, biometano, bioetanol, biohidrogênio etc. (MUSSGNUG *et al.*, 2010).

Microalgas são microrganismos geralmente microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos que possuem clorofila e são fototróficos, sendo capazes de utilizar CO₂ para produzir oxigênio na presença de luz. Estes organismos têm como habitat natural a água e são bastante diversificados quanto a sua morfologia e estrutura celular (OLAIZOLA, 2003).

As microalgas representam uma matéria-prima interessante para produção de biocombustíveis. Estes microrganismos têm um alto rendimento total e, portanto, uma menor pegada de uso da terra, além da possibilidade de utilização de áreas consideradas inadequadas para produção de alimentos. Adicionalmente, a produção de microalgas tem o potencial de absorver as emissões de CO₂ (WARD; LEWIS; GREEN, 2014).

O uso da digestão anaeróbia possibilita a recuperação de nutrientes valiosos, redução de custos associados ao tratamento e descarte de resíduos de microalgas, além de reduzir significativamente o potencial poluidor (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019; WARD; LEWIS; GREEN, 2014; ZHEN *et al.*, 2016). Por outro lado, o biogás, rico em metano, pode ser utilizado para fornecimento de calor e eletricidade ou como combustível veicular após ser refinado (ZHENG *et al.*, 2015).

Os primeiros autores a relatarem a digestão anaeróbia de biomassa algal foram Golueke *et al.* (1957). Eles investigaram a digestão de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* cultivadas em águas residuais. Anos após este primeiro estudo, pesquisas foram sendo desenvolvidas com vistas a otimizar a digestão anaeróbia das algas (CHEN; OSWALD, 1998; OSWALD; GOLUEKE, 1960).

Muitas são as vantagens da utilização de biocombustíveis derivados de microalgas, tais como: possibilidade de cultivo durante todo o ano; crescem em meio aquoso, mas necessitam de menos água doce do que culturas terrestres, além da possibilidade de cultivo em águas salobras; potencial de rápido crescimento; alta biofixação de emissões de CO₂ (1kg de biomassa seca de algas utiliza cerca de 1,83 kg de CO₂); seu cultivo não requer a aplicação de herbicidas ou pesticidas etc. (BRENNAN; OWENDE, 2010). Sendo assim, as vantagens supracitadas ressaltam as aplicações potenciais das microalgas como matéria-prima alternativa para produção de biocombustíveis.

Apesar de seu potencial inerente como recurso para produção de bioenergia, a utilização de biomassa algal para esse fim ainda tem vários desafios a serem superados antes de se tornar uma indústria convencional capaz de produzir a quantidade de biocombustível necessária a um preço competitivo (WARD; LEWIS; GREEN, 2014). Os principais desafios enfrentados pela indústria incluem os altos insumos necessários para o cultivo das microalgas, que requer grandes quantidades de fertilizantes (especialmente nitrogênio e fósforo), além dos desafios associados aos processos de produção dos biocombustíveis, tais como baixa biodegradabilidade da parede celular, desequilíbrio na composição celular, etc. (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014).

3.3.1 Microalgas e as lagoas de estabilização

As algas, para seu desenvolvimento, necessitam de água e nutrientes, além de dióxido de carbono (CO₂) e luz, como qualquer outra planta superior. Assim, o cultivo destes microrganismos em efluentes ricos em nutrientes garante maior sustentabilidade, tanto econômica quanto ambiental, ao processo de obtenção de biocombustíveis.

Dentre as diversas tecnologias de tratamento de esgotos (lodos ativados, filtros anaeróbios, reatores UASB etc.), as lagoas de estabilização, em especial as lagoas de alta taxa (LATs), são unidades com grande produção de algas, tendo em vista a alta disponibilidade de água e de nutrientes presentes nos esgotos domésticos. Durante seus processos metabólicos, as microalgas assimilam os nutrientes e auxiliam na depuração do efluente. Embora essas lagoas

apresentem boa eficiência na remoção de elementos indesejáveis, a elevada produtividade de biomassa algal ocasiona diversos problemas nos corpos receptores, tais como consumo de oxigênio, cor e turbidez (ASSEMANY, 2017).

Embora exista uma vasta literatura dedicada ao estudo de sistemas algas-bactérias para biorremediação de efluentes, a investigação destinada ao uso da biomassa gerada nesses sistemas ainda é escassa (GONZALEZ-FERNANDEZ; SIALVE; MOLINUEVO-SALCES, 2015). Alguns estudos têm buscado alternativas que possibilitem a obtenção de biocombustíveis a partir das microalgas cultivadas em lagoas de alta taxa, ao passo que os problemas citados sejam mitigados. Dentre as alternativas avaliadas, a digestão anaeróbia tem sido considerada uma das tecnologias mais apropriadas para maximizar a recuperação de recursos da biomassa algal produzida em efluentes (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019). Além de ser uma alternativa atrativa para destinação energética dessa biomassa, a DA possibilita uma minimização dos custos de colheita e concentração, uma vez que o substrato utilizado no processo de biodigestão deve ser preferencialmente úmido (ASSEMANY, 2017; CHEN *et al.*, 2014).

3.3.2 Obstáculos da utilização de microalgas como substrato

As propriedades químicas, físicas e biológicas da biomassa algal dependem das condições sob as quais ela é cultivada e, simultaneamente, determinam as condições do processo anaeróbio. A composição celular é fortemente dependente da espécie, mas também é afetada pelas condições ambientais (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). Quanto aos requisitos de nutrientes da microflora anaeróbia, a literatura mostra que estes são atendidos pela composição das microalgas, visto que elas apresentam em sua composição carbono, nitrogênio e fósforo, além de outros micronutrientes importantes como ferro, zinco e cobalto (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

De acordo com Brown *et al.* (1997), a composição celular desses microrganismos é muito variável de acordo com a espécie, apresentando, em geral, de 6 a 52% de proteínas, 7 a 23% de lipídeos e 5 a 23% de carboidratos. No entanto, independente da espécie, praticamente qualquer biomassa bruta de microalgas apresenta um baixo rendimento de metano, inferior aos valores teóricos. A conversão de biomassa algal não tratada em metano é geralmente incompleta, não excedendo 50% do potencial teórico de produção (KLASSEN *et al.*, 2016).

Dois obstáculos são reportados como principais responsáveis pela redução da eficiência de conversão da biomassa algal em metano. As maiores complexidades são reportadas como sendo a baixa biodegradabilidade da parede celular, bem como a inibição do processo pela presença de amônia, normalmente associada à baixa relação carbono-nitrogênio (C/N), algo comum à maioria das espécies de microalgas (MUSSGNUG *et al.*, 2010; SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos sobre digestão anaeróbia de biomassa algal já reportavam o problema das paredes resistentes das algas, demonstrando que uma fração significativa de células de microalgas permaneceu intacta após 30 dias de digestão (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957). Observações semelhantes foram feitas em estudos mais recentes, onde foi reportado células intactas de *Scenedesmus obliquus* identificadas em um digestor anaeróbio, mesmo após seis meses de início do experimento (MUSSGNUG *et al.*, 2010).

Apesar de a baixa biodegradabilidade da parede celular das microalgas ser considerada um dos principais obstáculos que governam a eficiência do processo de digestão anaeróbia, somente algumas poucas informações acerca da composição da parede celular são disponíveis para a maioria das espécies (GANESH SARATALE *et al.*, 2018). Em geral, as paredes celulares das algas são compostas por dois componentes: o componente fibrilar, que forma o esqueleto da parede, e o componente amorfo, que forma uma matriz dentro da qual o componente fibrilar está submerso (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). Paredes celulares complexas, como é o caso dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, são compostas de uma camada superficial, que pode ser homogênea ou possuir um revestimento trilaminar. Essa camada superficial é resistente à degradação anaeróbia, uma vez que é composta de esporopolenina, também chamada de *algaenan*, que é um biopolímero semelhante à lignina, formado de ácidos graxos hidroxilados e fenólicos (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014).

Métodos de pré-tratamento, com ou sem recuperação de coprodutos, têm sido aplicados para romper a parede celular das microalgas, tornar seu conteúdo intracelular mais disponível e melhorar a biodegradabilidade anaeróbia das microalgas, porém, em muitas aplicações, ainda não se sabe se o benefício do aumento da produção de metano pode justificar o custo da energia necessária para o pré-tratamento (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2013).

Outra limitação importante para a digestão anaeróbia de microalgas é o risco de inibição do nitrogênio amoniacal, normalmente associado à baixa relação carbono-nitrogênio (C/N) das diversas espécies de microalgas (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019). A proporção de carbono para

nitrogênio das microalgas de água doce é em média 10,2, enquanto as plantas terrestres têm essa proporção de cerca de 36. Quando a relação C/N está abaixo de 20, há um desequilíbrio entre as exigências de carbono e nitrogênio para a comunidade anaeróbia. Este desequilíbrio leva à liberação de nitrogênio na forma de amônia durante a digestão, podendo tornar-se inibitória para os microrganismos (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Durante a digestão anaeróbia, as proteínas são degradadas e a amônia se acumula na fase líquida. O valor do pH e a temperatura controlam a proporção entre íons amônio (NH_4^+) e amônia livre (NH_3). Se a concentração de biomassa algal no afluente for elevada ou se essa biomassa apresentar pouco teor de carbono em relação a nitrogênio, haverá presente no reator altas concentrações de NH_3 e alcalinidade e, como consequência, poderá ocorrer a inibição do processo pela amônia livre (MCCARTY, 1964). A forma não ionizada do nitrogênio sofre difusão através das membranas celulares, causando desequilíbrio de prótons e/ou deficiência de potássio, expressando assim sua toxicidade (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Entre os quatro tipos de microrganismos anaeróbios, os metanogênicos são os menos tolerantes e os mais propensos a cessar o crescimento devido à presença de altas concentrações de amônia no reator (KAYHANIAN, 1994). Algumas pesquisas baseadas na comparação da produção de metano e da taxa de crescimento, indicaram que o efeito inibitório foi, em geral, mais intenso para as *arqueas* metanogênicas acetoclásticas do que para as hidrogenotróficas (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

Acredita-se que concentrações de nitrogênio amoniacal abaixo de 200 mg/L são benéficas para o processo anaeróbio, uma vez que o nitrogênio é um nutriente essencial para os microrganismos anaeróbios (LIU; SUNG, 2002). Por outro lado, concentrações de amônia variando de 1,7 a 14 g/L, foram relatadas na literatura como responsáveis pela redução da produção de metano em até 50%. Esta ampla faixa de concentrações inibitórias pode ser atribuída à natureza dos substratos e inóculos, condições ambientais (temperatura, pH) e períodos de aclimação (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

Um aumento no pH resulta na mudança da forma ionizada (NH_4^+) para amônia livre e, conseqüentemente, um aumento da toxicidade. A instabilidade do processo devido à amônia geralmente resulta no acúmulo de ácidos graxos voláteis, o que leva a uma diminuição do pH e, portanto, à redução da concentração de amônia livre. Essa interação pode levar a um estado estacionário inibido, condição em que o processo funciona de forma estável, mas com redução do rendimento de metano (ANGELIDAKI; AHRING, 1993).

Tanto as taxas de crescimento microbiano quanto a concentração de amônia são afetadas pela mudança de temperatura. Um aumento na temperatura do processo, em geral, tem um efeito positivo na taxa metabólica dos microrganismos, mas também resulta em uma maior liberação de amônia. Vários autores reportaram que a fermentação anaeróbia de resíduos com alta concentração de amônia era mais facilmente inibida e menos estável em temperaturas termofílicas do que em temperaturas mesofílicas. Por outro lado, a presença de elevadas concentrações de íons como Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , que aumentam a alcalinidade e diminuem a fração não ionizada NH_3 , são reportados como antagonistas da inibição por amônia, fenômeno no qual a toxicidade de um íon é diminuída pela presença de outro(s) íon(s) (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

De forma a contornar os efeitos negativos da baixa relação C/N, muitos autores têm investigado a co-digestão de biomassa algal com substratos ricos em carbono, que possibilitem um aumento da produção de metano sem aumentar a carga de nitrogênio nos reatores.

3.3.3 Co-digestão anaeróbia de biomassa algal

A co-digestão é um método de tratamento no qual diferentes substratos são misturados e tratados juntos. Esta estratégia é um processo energeticamente eficiente que pode melhorar o desempenho da fermentação pela adição de um substrato secundário que fornece nutrientes que faltam no substrato inicial, melhorando os parâmetros físico-químicos do processo, além dos efeitos sinérgicos e atenuação da inibição que ocorreria durante a digestão do substrato individual (PARK; LI, 2012).

A co-digestão é preferencialmente utilizada visando melhorar os rendimentos da digestão anaeróbia devido aos seus diferentes benefícios. Diluição de compostos tóxicos, aumento da carga de matéria orgânica biodegradável, redução do desequilíbrio de nutrientes, ajuste da relação C/N, prevenção de efeitos inibitórios, efeito sinérgico de microrganismos, facilidade de manuseio de substratos mistos, vantagens econômicas devido ao compartilhamento de equipamentos e melhor rendimento de biogás são alguns dos benefícios potenciais que podem ser alcançados em um processo de co-digestão (PARK; LI, 2012; SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Devido ao fato de que a maioria das espécies de microalgas apresentam uma relação C/N considerada baixa, a adição de um co-substrato rico em carbono pode facilitar o processo de conversão em metano (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). Microalgas e resíduos de

microalgas têm sido co-digeridos com uma grande variedade de co-substratos, como lodo de esgoto, esterco animal, resíduos de alimentos, glicerol, culturas energéticas, resíduos de papel e óleos, graxas e gorduras (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019).

A Tabela 1 resume condições experimentais e rendimentos de metano para alguns estudos que avaliaram a co-digestão de biomassa algal com diferentes substratos orgânicos. Destaca-se a grande variabilidade dos resultados obtidos pelos estudos, dependendo da espécie de microalga, do co-substrato utilizado e das condições operacionais dos reatores.

Como pode ser verificado na Tabela 1, em todos os estudos apresentados houve um aumento do rendimento de metano dos testes de co-digestão com relação aos testes contendo apenas biomassa algal. Além disso, efeitos sinérgicos nos rendimentos podem ser observados.

Yen e Brune (2007) obtiveram significativo incremento na produção de metano através da adição de resíduos de papel à biomassa algal. A produção de metano praticamente dobrou com a co-digestão mencionada, em uma razão de 1/1 entre resíduo de papel e biomassa algal, aumentando a relação C/N de 6,7 para 18. Ehimen *et al.* (2009), aumentando a proporção C/N para 12,44 através da co-digestão de resíduos de microalgas com glicerol, observaram um aumento de produção de metano em mais de 50%, comparando-se com a produção de metano quando os resíduos foram digeridos individualmente.

Tabela 1 – Resumo da produção de metano com diferentes substratos utilizados na co-digestão anaeróbia com microalgas em reatores de batelada em escala de bancada

Tempo de operação, temperatura (°C), relação S/I ¹ e observações	Substratos	C/N ²	Rendimento de metano (NmLCH ₄ .gSV ⁻¹)	Referências
45 dias, 37 ° C, agitação magnética	• Microalgas <i>Chlorella sp.</i> • Lodo ativado • Microalgas: lodo ativado=4:96%	–	123 302 298	Wang <i>et al.</i> (2013)
25 dias e 0,5 gSV/gSV	• Microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> • Resíduos de batata • Microalgas: resíduos=25:75%	6,43 40,78 22,77	176 439 266	Zhang <i>et al.</i> (2018)
35 dias, 35 ± 1 °C, 0,5 gSV/gSV, agitação manual diária	• Microalgas <i>Chlorella sp.</i> • Esterco de galinha • Microalgas: esterco=20:80%	4,86 12,28 –	94 146 170	Li <i>et al.</i> (2017)
60 dias, 35 °C, 1 gSV/gSV, os lipídeos foram extraídos das microalgas	• Microalgas <i>Botryococcus braunii</i> • Glicerina residual • Microalgas: glicerol=90:10%	–	404 302 428	Neumann <i>et al.</i> (2015)
40 dias, 37 °C, 0,5 gSV/gSV, os lipídeos foram extraídos das microalgas	• Microalgas <i>Scenedesmus</i> • Glicerina residual • Microalgas: glicerina=88,9:11,1%	6,1 – 6,8	212 – 255	Ramos-Suárez e Carreras. (2013)
100 dias, 37 °C, 1 gSV/gSV, agitação de 90rpm	• Microalgas <i>Chlorella sp.</i> • Palha de trigo • Microalgas: palha=50:50%	7,4 95,4 13,1	264 280 289	Solé-Bundó <i>et al.</i> (2017)
40 dias, 35 °C, 0,5 gSV/gSV, agitação de 100rpm	• <i>Chlorella sp. e Scenedesmus sp.</i> • Resíduos alimentares • Microalgas: resíduos=20:80%	–	107 576 640	Zhen <i>et al.</i> (2016)
25 dias, 35 °C, 0,5 gSV/gSV, agitação de 500rpm	• Microalga <i>Dunaliella salina</i> • Resíduos de azeitona • Microalgas: resíduos=50:50%	12,6 31,4 22	63 321 285	Fernández-Rodríguez <i>et al.</i> (2014)

¹S/I: substrato/inóculo. ²C/N: carbono/nitrogênio. Fonte: o autor (2022).

3.3.3.1 Glicerol

O glicerol é um poli-álcool que tem como nomenclatura, de acordo com IUPAC, 1,2,3 – propanotriol, de fórmula molecular $C_3H_5(OH)_3$. Apresenta-se no estado líquido à temperatura ambiente, é higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (WANG *et al.*, 2001). Este subproduto pode ser obtido através da reação de transesterificação entre um óleo vegetal ou gordura animal (triglicerídeo) para obtenção de metil-ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e consequente liberação do glicerol, intermediada por um álcool (geralmente metanol), na presença de um catalisador químico (normalmente uma base forte, como NaOH ou KOH). A separação do biodiesel do glicerol é normalmente realizada por gravidade, já que o biodiesel possui densidade inferior ao glicerol (VIANA, 2011).

O glicerol puro (com mais de 95% de pureza) é matéria prima em diversas áreas, tais como pintura, cosméticos, indústria automotiva, alimentos, papel e celulose, couro, têxtil e produção de produtos químicos (WANG *et al.*, 2001). No entanto, o glicerol oriundo da produção de biodiesel, possui impurezas que afetam e encarecem seu processamento industrial, sendo mais comumente denominado de glicerina residual. A glicerina residual é gerada em grandes quantidades, sendo considerada a produção de 10kg de glicerina, com 55-90% de glicerol, para cada 100kg de biodiesel produzido (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Entre as impurezas contidas na glicerina, encontram-se ácidos graxos, metanol, catalisadores, sais de potássio e sódio, metais pesados, sabão, água, lignina e outras impurezas orgânicas (SILES LÓPEZ *et al.*, 2009). A concentração destas impurezas, bem como parâmetros físico-químicos, como pH, densidade, cor e concentração de matéria orgânica, variam em função da natureza do óleo vegetal ou animal e do processo de fabricação do biodiesel (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008). Dentre as impurezas citadas, existem quatro que podem afetar significativamente o metabolismo microbiano, pois são consideradas compostos tóxicos ou recalcitrantes. São elas: ácidos graxos de cadeia longa, cloretos, sulfatos e sulfetos (VIANA, 2011).

O Brasil vem incorporando o biodiesel na matriz energética nacional por meio do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel (Probiobiodiesel), criado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia por meio da Portaria 702, e da Medida Provisória 214, de 13 de setembro de 2004, convertida na Lei nº 11,097, de 13 de janeiro de 2005 (BRASIL, 2005). Atualmente, 11% de biodiesel (B11) é adicionado ao óleo diesel de origem fóssil,

conforme estabelecido pela Lei 13.263/2016, com perspectivas de aumento gradativo deste percentual ao longo dos anos (BRASIL, 2016).

Em 2021, estima-se que cerca de 676000 toneladas de glicerina foram produzidas no país, um aumento de 183% com relação ao ano de 2010, por exemplo (ANP, 2021). Com o constante crescimento da indústria de biodiesel, é gerado um excedente de glicerina que ocasiona problemas ambientais e econômicos associados à eliminação desse subproduto, visto que a sua oferta está se tornando bem maior do que a demanda (SILES LÓPEZ *et al.*, 2009). No Brasil, não há dispositivos legais quanto à destinação desse subproduto. Entretanto, o descarte inadequado no meio ambiente pode causar problemas graves, como o aumento da demanda bioquímica de oxigênio de corpos receptores; e a sua combustão libera compostos cancerígenos, como a acroleína (NOVI *et al.*, 2018).

Devido ao aumento gradativo da proporção de biodiesel adicionado ao diesel, tem sido cada vez mais necessárias alternativas de reaproveitamento da glicerina residual de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável, visto que o mercado não absorve integralmente este co-produto, sendo de extrema importância a busca por novas aplicações (ROBRA, 2006). Uma das aplicações que agrega valor à glicerina é a digestão anaeróbia desse produto para geração de energia.

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

A literatura, em geral, é escassa no que diz respeito à digestão anaeróbia de glicerina residual do biodiesel, porém alguns trabalhos relatam o desempenho desse substrato frente à DA, bem como as limitações encontradas e sugestões de melhorias de parâmetros para degradação biológica e produção de biogás a partir da glicerina. Estudos anteriores indicam que a associação de diferentes substratos com glicerina, seja bruta ou purificada, favoreceu a digestão anaeróbia de tais substratos, demonstrando as potencialidades da glicerina como co-substrato (TAKEDA, 2021).

O uso de glicerina bruta como co-substrato foi bem-sucedido em pesquisa realizada por Neumann *et al.* (2015). Os autores avaliaram a co-digestão de microalgas da espécie

Botryococcus braunii com glicerina, através de testes em batelada, sob condição mesofílica (35° C). Os resultados da co-digestão de *Botryococcus braunii* e glicerina, na proporção 9:1, promoveu um rendimento específico de metano de 428 NmL CH₄/gSV. Com relação à digestão individual da glicerina e da biomassa algal, o aumento foi de 42 e 6%, respectivamente. Robra (2006), ao avaliar a co-digestão anaeróbia de glicerina e estrume de gado, obteve melhores resultados na produção de biogás e teor de metano em relação à digestão dos substratos isoladamente.

Tendo em vista as impurezas que podem ser encontradas na glicerina bruta, com potencial de inibição da metanogênese e possível colapso de um reator anaeróbio, neste estudo optou-se pela utilização da glicerina acidificada nos experimentos de co-digestão com biomassa algal e vinhaça. O procedimento utilizado para acidificação da glicerina será apresentado mais adiante no tópico 4.2.

3.3.3.2 Vinhaça

A vinhaça, ou vinhoto, compreende a principal água residuária da cadeia produtiva do etanol, sendo gerada especificamente na etapa de destilação, a uma taxa média de 13 litros por cada litro de etanol produzido (XAVIER, 2007). Este efluente apresenta cor marrom-escuro, cujo teor orgânico pode ser 100 vezes maior do que o encontrados nos esgotos domésticos. Apresenta também características ácidas e corrosivas, bem como concentrações significativas de potássio e sulfato, além de outros macro e micronutrientes (FUESS; GARCIA, 2014). Na etapa de fermentação, no processo produtivo do etanol, o ácido sulfúrico é utilizado para correção do pH e prevenção da floculação de leveduras, o que resulta na característica sempre ácida do efluente, com variações de pH entre 3,5 e 5,0, além de ser o principal responsável pelas altas concentrações de sulfato (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

De maneira geral, o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de bioetanol, com 26% da produção total em 2017, conforme dados estatísticos da *Renewable Fuels Association* (RFA). Avanços tecnológicos na indústria sucroalcooleira, possibilitados por programas governamentais como o Proálcool, instituído em 1975, possibilitaram o crescimento do setor, tornando o país referência mundial na produção de etanol à base de cana-de-açúcar (COELHO *et al.*, 2006).

A produção de cana-de-açúcar na safra 2020/21 foi estimada em 665 milhões de toneladas, com um acréscimo de 3,5% da produção referente à safra anterior de 2019/20. Na

safras de 2019/20 a produção de etanol no Brasil foi de 35,7 bilhões de litros de etanol, anidro e hidratado, enquanto na safra 2020/21 foram produzidos cerca de 32,9 bilhões de litros deste biocombustível (CONAB, 2020).

Durante décadas, o principal destino da vinhaça no Brasil tem sido sua aplicação nas lavouras de cana-de-açúcar como fertilizante, devido ao seu teor de matéria orgânica e nutrientes (especialmente potássio, mas também nitrogênio e fósforo), prática conhecida como fertirrigação. No entanto, um grande problema da fertirrigação está nos grandes volumes de vinhaça aplicada no solo, o que desencadeia uma série de efeitos ambientais na área plantada quando é feita a aplicação contínua de vinhaça no solo (DJALMA NUNES FERRAZ JÚNIOR *et al.*, 2016; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). A disposição inadequada e indiscriminada da vinhaça em solos provoca alterações nas suas características, resultando em modificações de suas propriedades químicas e físicas, dentre elas a acidificação permanente do solo, salinização, lixiviação de metais e sulfato, contaminação das águas subterrâneas, bem como a liberação de odores desagradáveis e a possível atração de insetos (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Os critérios para disposição da vinhaça em usos agrícolas são regulamentados, no estado de São Paulo, pela Portaria Estadual nº 4.231, estabelecida pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2015), porém, a taxa de aplicação da vinhaça no solo se baseia apenas na concentração de potássio, sendo negligenciados os impactos do baixo pH e alto teor de matéria orgânica deste resíduo no solo.

Segundo dados da Associação Brasileira de Biogás – ABIOGÁS, o potencial de produção de biogás no Brasil é de 82 bilhões de metros cúbicos por ano, sendo o setor sucroenergético responsável por 48% deste potencial (ABIOGÁS, 2018). Dessa forma, ao invés de destinar a vinhaça bruta à fertirrigação, o emprego da digestão anaeróbia deste substrato tem alta potencialidade para produção de metano, além de reduzir o potencial poluidor e preservar nutrientes como potássio, nitrogênio e fósforo, que permanecem no digestato após o processo de digestão da vinhaça (FUESS; GARCIA, 2014).

A aplicação da digestão anaeróbia no tratamento da vinhaça é uma solução atrativa devido à redução de carga orgânica, baixo custo de operação, produção de energia limpa e possibilidade de aplicação da vinhaça biodigerida como fertilizante nas áreas agrícolas, associando o conceito de biorrefinaria ao setor sucroalcooleiro (FUESS; GARCIA, 2014; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, Pernambuco, Brasil. Os testes de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) foram realizados utilizando os substratos biomassa algal, glicerina residual de biodiesel e vinhaça de cana-de-açúcar, e um inóculo proveniente de um reator anaeróbio tratando águas residuais de uma cervejaria.

4.1 Inóculo

O inóculo utilizado nos experimentos foi um lodo anaeróbio proveniente de um reator anaeróbio BIOPAC[®]IC tratando águas residuais de uma indústria de produção de cerveja, localizada no município de Itapissuma, Pernambuco, operando sob condição mesofílica (37° C).

Após a coleta, foi feita a elutriação do lodo para separação do material inerte e biomassa inativa ou de baixa atividade, que possui como característica baixa capacidade de sedimentação. No processo de elutriação, o lodo é homogeneizado com água deionizada e espera-se decantar, desprezando o sobrenadante. O procedimento é feito até que a água da superfície esteja visualmente límpida. Após a elutriação, o lodo foi incubado em uma sala termostaticada (30° C), para reduzir a produção de metano endógeno.

O inóculo anaeróbio (lodo) foi caracterizado em relação ao seu pH, concentração de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), e alcalinidade total e parcial, conforme APHA (2017). Os resultados da caracterização do lodo podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização do lodo utilizado como inóculo

Parâmetros	Valores
pH	7,45
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	45902 ± 198
Sólidos totais voláteis (mg.L ⁻¹)	38230 ± 803
SV/ST (%)	83,29
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	1261,86
Alcalinidade parcial (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	793,08

Fonte: o autor (2022).

4.2 Coleta dos substratos

A biomassa algal foi coletada em uma Lagoa de Alta Taxa (LAT) escala piloto (Figura 2), utilizada para pós-tratamento de esgoto sanitário de um reator UASB, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Mangueira, no município de Recife, Pernambuco. Durante a coleta, foi utilizada uma peneira de aço inoxidável com abertura de 0,250 mm para concentração da biomassa. Em seguida, a amostra foi lavada com água deionizada e armazenada a 4° C, para posterior caracterização e utilização nos experimentos. As características construtivas da lagoa estão apresentadas na Tabela 3.

Figura 2 – Coleta de biomassa algal: (a) lagoa de alta taxa. (b) concentração da biomassa algal utilizando peneira com abertura de 0,250 mm



Fonte: o autor (2022).

Tabela 3 – Parâmetros construtivos da lagoa de alta taxa

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

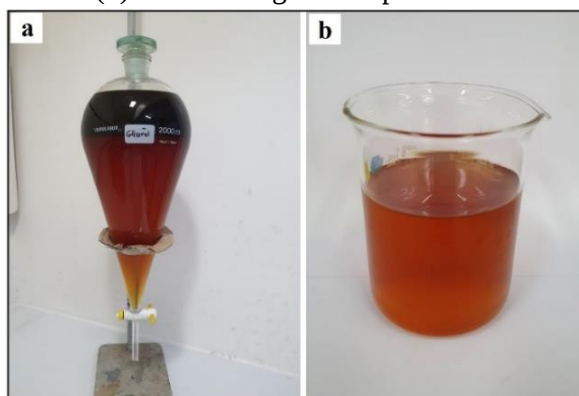
Fonte: Sátiro (2021).

A glicerina residual foi coletada na Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos (BERSO), situada na Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife. A usina utiliza óleo de fritura e álcool para produção do biodiesel.

Após caracterização, foi verificado um baixo teor de glicerol na glicerina residual (40,2%). Visando aumentar o percentual de glicerol e, conseqüentemente reduzir as impurezas

presentes, foi realizado um processo de purificação. Inicialmente, a glicerina residual foi acidificada ($\text{pH} \approx 3$), utilizando ácido clorídrico concentrado (HCl). Posteriormente, a amostra acidificada foi colocada em um funil de separação, possibilitando a separação de fases, onde a fase orgânica (óleos residuais, ácidos graxos etc.) fica localizada na parte superior do funil, enquanto a glicerina purificada fica na parte inferior (Figura 3). Após purificação, a glicerina foi armazenada a 4°C , até sua utilização nos experimentos.

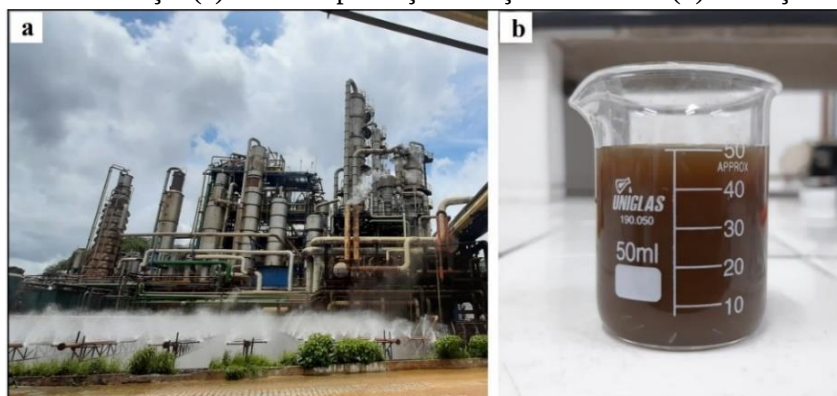
Figura 3 – Purificação da glicerina residual: (a) separação de fases da amostra em funil de separação. (b) amostra de glicerina purificada



Fonte: o autor (2022).

A vinhaça foi coletada em uma usina de produção de açúcar e etanol (Figura 4) a partir de cana-de-açúcar, localizada no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Após a coleta, a vinhaça foi armazenada a -20°C , até sua caracterização e utilização nos experimentos.

Figura 4 – Coleta da vinhaça: (a) usina de produção de açúcar e etanol (b) vinhaça de cana-de-açúcar



Fonte: o autor (2022).

4.3 Métodos analíticos

A caracterização físico-química dos substratos, bem como do inóculo, foi realizada conforme métodos analíticos enquadrados no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017), e estão identificados na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros e respectivos métodos analíticos utilizados na caracterização dos substratos e do inóculo.

Parâmetro	Unidade	Método analítico
pH	-	Eletrométrico (4500-H ⁺ B)
Alcalinidade total e parcial	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	Titulométrico (2320 B)
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	mg O ₂ .L ⁻¹	Colorimétrico (5220 D)
Nitrogênio Total (NTK)	mg.L ⁻¹	Titulométrico (4500-NTK B)
Nitrogênio Amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	mg.L ⁻¹	Titulométrico (4500-NH ₃ C)
Fósforo Total (P Total)	mg.L ⁻¹	Colorimétrico (4500-P C)
Série de sólidos (ST, SV, SF)	mg.L ⁻¹	Gravimétrico (2540 B.;D.; E)

Fonte: APHA (2017).

A quantificação de AGVs (ácidos graxos voláteis) foi realizada através de cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso com detecção por ionização de chama (GC-FID) da *Agilent Technologies* 7890A, com coluna J&W GC Column DB-WAXERT 122-7332; 260°C; 30 m 250 µm x 0,25 µm. Os ácidos analisados foram: acético; propiônico isobutírico; butírico; isovalérico; valérico e capríco, cuja faixa de detecção foi de 4,4 mg.L⁻¹ a 100 mg.L⁻¹. As condições do método estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições cromatográficas para análise de AGVs

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

Fonte: o autor (2022).

O percentual de glicerol na glicerina residual foi determinado através de um cromatógrafo líquido HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Japão) equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e coluna Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm (BIORAD, EUA) a 40 °C, com fluxo de fase móvel (H₂SO₄, 5 mM) e volume de injeção iguais a 0,6 mL.min⁻¹ e 20 µL, respectivamente.

Quanto à caracterização macromolecular da biomassa algal, o teor de lipídeos totais foi determinado pelo método adaptado de Bligh e Dyer (1959), utilizando o equipamento Soxhlet e determinando a fração lipídica por gravimetria. A concentração total de proteínas foi estimada considerando o teor de nitrogênio total kjeldahl (NTK) e o fator de conversão geral de 6,25 (PRAJAPATI; MALIK; VIJAY, 2014). As composições de proteínas e lipídeos foram calculadas como a percentagem em termos do conteúdo de sólidos totais da biomassa utilizada.

O teor de carboidratos foi calculado subtraindo o teor de cinzas, proteínas e lipídeos dos sólidos totais (SURESH *et al.*, 2013).

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

$$COT (mg/L) = 0,425 * DQO(mg/L) - 2,064 \quad (1)$$

4.4 Biodegradabilidade anaeróbia

A biodegradabilidade anaeróbia (%) das misturas avaliadas foi determinada a partir do volume líquido de metano (NmL), e do rendimento teórico de metano (350 mL CH₄/g DQO removida), em relação à DQO inicial de cada ensaio, conforme Equação (2) (PASSOS; GARCÍA; FERRER, 2013).

$$Biodegradabilidade (\%) = \frac{[(CH_4(NmL))/350 (NmL CH_4/gDQO_{removida})]}{gDQO_{inicial}} * 100 \quad (2)$$

4.5 Índice de sinergia

O sinergismo da mistura de vários substratos pode ser identificado quando o rendimento de metano da co-digestão é maior do que a soma do rendimento de metano de cada substrato individual. Por outro lado, se o rendimento de metano da mistura for menor que a soma do rendimento de metano de cada substrato digerido individualmente, ocorre antagonismo (RAMOS-SUÁREZ; CARRERAS, 2014).

Neste estudo, o índice de sinergia (IS) foi calculado para avaliar o efeito sinérgico da co-digestão para cada mistura de substratos. O índice foi determinado como a razão entre os rendimentos de metano observados e esperados (DONOSO-BRAVO *et al.*, 2019), conforme apresentado pela Equação (3).

$$IS = \frac{CH_4 \text{ observado}}{CH_4 \text{ esperado}} \quad (3)$$

O valor de rendimento esperado é baseado no efeito proporcional de cada substrato na mistura, obtido a partir dos rendimentos individuais de cada substrato, de acordo com a Equação (4).

$$CH_4 \text{ esperado} = \sum CH_4 (S_i) \cdot \%S_i \quad (4)$$

Onde:

$CH_4 (S_i)$: rendimento de metano da digestão individual do substrato i ;

$\%S_i$: percentual do substrato i na mistura.

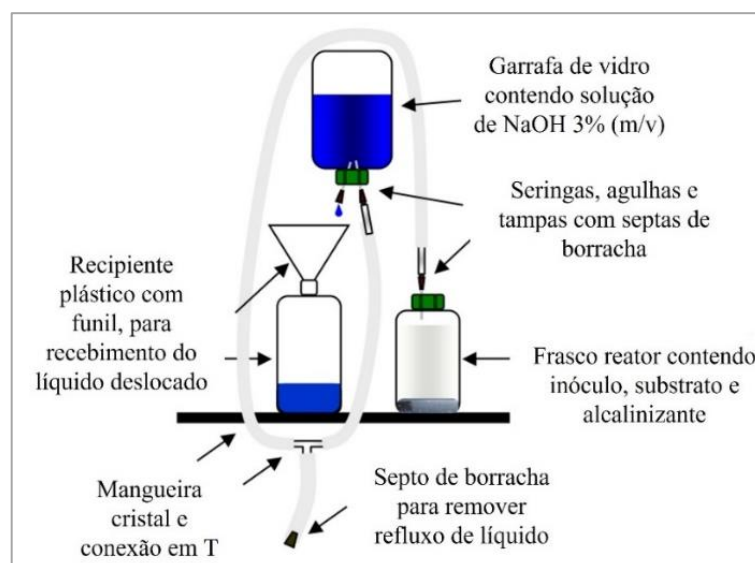
4.6 Testes do potencial bioquímico de metano (PBM)

A biodegradabilidade anaeróbia dos substratos foi avaliada através de testes de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), enquanto testes de Atividade Metanogênica Específica (AME) foram utilizados para avaliar a capacidade máxima de produção de metano do inóculo. Os testes foram realizados utilizando o mesmo aparato experimental, alterando apenas o substrato e indicadores avaliados.

Os testes de PBM foram conduzidos em batelada, utilizando frascos reatores de borossilicato, com volume total de aproximadamente 300 mL e volume útil de 240 mL. A produção diária de metano foi medida de acordo com Aquino *et al.* (2007), através de gravimetria, a partir do deslocamento de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH – 3% m/v) de uma garrafa invertida, conectada ao reator através de uma mangueira cristal transparente, como pode ser observado na

Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática do aparato utilizado para os testes de PBM e AME



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

O volume da solução de NaOH deslocado, corresponde ao volume de metano (CH₄) produzido, uma vez que a solução promove a lavagem do biogás, absorvendo o dióxido de carbono (CO₂), de acordo com as seguintes reações:



Foi adotada uma relação substrato/inóculo (S/I) de 0,5 gSV.gSV⁻¹ e concentração inicial de substrato de 2,5 gSV.L⁻¹. Após a adição do inóculo e substratos, quando necessário, o pH foi corrigido para aproximadamente 7, utilizando solução de HCl 1M ou NaOH 40% m/v. Posteriormente, foi utilizada água deionizada para obtenção do volume útil reacional. Para garantir um sistema devidamente tamponado, bicarbonato de sódio (NaHCO₃) foi adicionado na proporção 1g NaHCO₃.gDQO_{adicionada}⁻¹.

Após o lacre dos frascos com septos de borracha, todos os reatores foram purgados, durante 2 minutos, com gás nitrogênio, visando garantir condições anaeróbias ao meio, através da eliminação do oxigênio presente. Foram montados reatores controle (contendo apenas inóculo e alcalinizante), que têm como objetivo estimar o volume de metano produzido por meio da respiração endógena, para subtrair o valor obtido nos frascos contendo substrato.

Os reatores foram envoltos de papel alumínio para evitar penetração da luz, e agitados manualmente antes de cada medição da produção quantitativa de metano. A incubação foi feita a uma temperatura de 30 °C, em sala termostatzada, conforme apresentado na Figura 6. Os testes foram conduzidos por 28 dias.

Figura 6 – Reatores instalados na sala termostatzada do LSA



Fonte: o autor (2022).

A caracterização do meio reacional dos reatores foi realizada no início e no fim do experimento. Após a finalização dos testes, o biogás dos reatores foi caracterizado por meio de cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo *Agilent Technologies GC 7890 A*, dotado de detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar (Carboxen 1010 PLOT, 30m x 0,53mm). O método de determinação está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições cromatográficas para análise da composição do biogás

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

Fonte: o autor (2022).

Os volumes acumulados de metano de cada reator foram convertidos para as Condições Normal de Temperatura e Pressão (CNTP), de 0 °C ou 273K e 1 atm. Por fim, o potencial bioquímico de metano foi calculado de acordo com a Equação (8), apresentada a seguir:

$$PBM = \frac{NmL CH_4}{gSV_{ad}} \quad (8)$$

Onde:

PBM: potencial bioquímico de metano ($NmL CH_4.gSV_{adicionado}^{-1}$);

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

gSV_{ad} : massa de sólidos voláteis adicionada ao reator ($g SV$);

4.7 Testes de atividade metanogênica específica (AME)

O teste de AME consiste na adição de lodo, solução de nutrientes e substrato de fácil degradação, com o intuito de definir a máxima capacidade de produção de metano pelos microrganismos presentes no inóculo (AQUINO *et al.*, 2007).

O aparato experimental utilizado foi o mesmo dos testes de PBM, sendo o volume total dos frascos de 500 mL e volume reacional de 450 mL. O substrato escolhido foi uma solução de acetato de sódio ($100 g.L^{-1}$), tendo em vista que a maior parte do metano, cerca de 70%, advém da conversão do acetato pelos microrganismos metanogênicos acetoclásticos. Foram

avaliadas diferentes concentrações de inóculo (1; 1,5; 2; 2,5 e 4 gSV.L⁻¹), sendo a concentração de substrato fixada em 4 gDQO.L⁻¹. Os testes foram realizados em duplicata, e tiveram uma duração de 23 dias. A solução de macro e micronutrientes utilizada neste estudo segue as concentrações propostas por Florencio *et al.* (1993), e podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição da solução de macro e micronutrientes

Solução	Reagente	Concentração (g.L ⁻¹)
Macronutrientes	K ₂ HPO ₄	0,252
	NH ₄ Cl	0,280
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,100
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,010
	NaHCO ₃	0,400
	Extrato de levedura	0,100
Micronutrientes	FeCl ₂ .4H ₂ O	2,000
	ZnCl ₂	0,050
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,500
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,142
	H ₃ BO ₃	0,050
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,000
	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,090
	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,050
	EDTA	1,000
	Resazurina	0,200

Fonte: Adaptado de Florencio *et al.* (1993).

O volume de metano produzido e acumulado foi corrigido de acordo com as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Assim, a atividade metanogênica específica máxima foi obtida através da tangente no período de máxima inclinação da curva. O valor da AME foi expresso em massa de DQO convertida em metano (g CH₄-DQO.gSV⁻¹.d⁻¹), conforme Equação (9).

$$AME = \frac{\partial_{CH_4}}{\partial t} \frac{1}{gSV_{ad} \cdot f_{CH_4}} \quad (9)$$

Onde:

AME: atividade metanogênica específica (g CH₄-DQO.gSV.d⁻¹);

$\partial_{CH_4}/\partial t$: taxa de produção de metano (NmL CH₄. d⁻¹);

f_{CH_4} : fator de conversão de DQO para metano (NmL CH₄. g DQO⁻¹);

gSV_{ad} : massa de lodo adicionada ao reator, em termos de sólidos voláteis (g SV).

4.8 Cinética de hidrólise

Para o estudo cinético, foi utilizada uma equação oriunda de uma reação de primeira ordem, conforme proposto por Angelidaki *et al.* (2009) e mostrado na Equação (10).

$$\frac{dS}{dt} = -kS \quad (10)$$

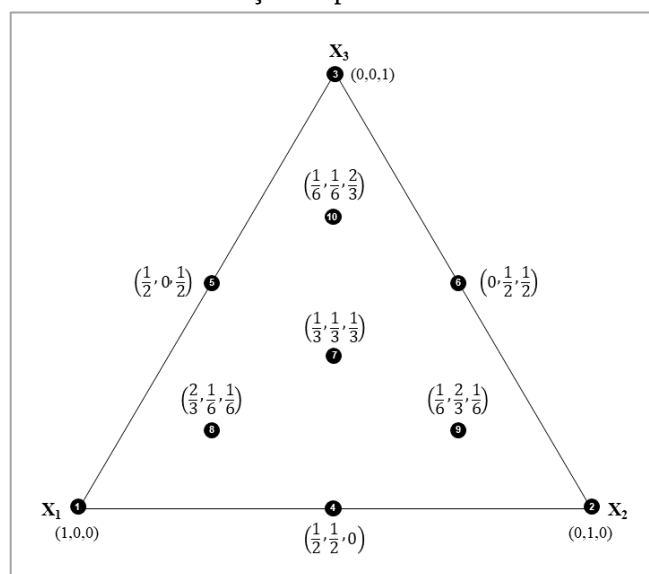
Onde, S representa um substrato orgânico complexo, k é a constante de primeira ordem e t é o tempo. Integrando a equação, o valor de k pode ser obtido através da Equação (11), onde B_{∞} representa a concentração final do produto de hidrólise, que neste estudo foi considerado a produção de metano, e B representa a concentração deste produto no tempo t . De posse da constante de hidrólise de cada mistura, o tempo de detenção hidráulica (TDH) foi estimado através do inverso do valor de k (ANGELIDAKI *et al.*, 2009).

$$\ln \frac{B_{\infty} - B}{B_{\infty}} = -kt \quad (11)$$

4.9 Planejamento e análise das misturas

Para avaliar o efeito da co-digestão no rendimento específico de metano e no índice de sinergia, as misturas dos substratos nos testes PBM foram delineadas pelo planejamento centróide simplex com três componentes ($q = 3$) e adição de pontos internos, resultando em 3 componentes puros mais 7 misturas binárias e ternárias. Os testes contendo substratos puros e misturas binárias, foram realizados em duplicata, enquanto os testes contendo misturas ternárias foram realizados em triplicata. O planejamento foi realizado pelo software Statistica 10.0, desenvolvido pela StatSoft®. A Figura 7 representa um diagrama do planejamento centróide simplex proposto, enquanto a Tabela 8 apresenta a matriz de experimentos utilizada no planejamento de mistura, em termos de concentração inicial de sólidos voláteis e o volume de cada substrato utilizado nas misturas.

Figura 7 – Representação do planejamento de misturas de substratos (x_1 , x_2 e x_3) centróide simplex com adição de pontos internos



Fonte: o autor (2022).

Tabela 8 – Matriz experimental do centróide simplex em termos de concentração inicial e volume de cada substrato

Mistura	Biomassa algal			Vinhaça			Glicerina residual		
	Valor cod. ¹	Concentração (gSV.L ⁻¹)	Volume (mL)	Valor cod.*	Concentração (gSV.L ⁻¹)	Volume (mL)	Valor cod.*	Concentração (gSV.L ⁻¹)	Volume (mL)
1	1,00	2,50	44,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	1,00	2,50	33,86	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,50	1,52
4	0,50	1,25	22,06	0,50	1,25	16,93	0,00	0,00	0,00
5	0,50	1,25	22,06	0,00	0,00	0,00	0,50	1,25	0,76
6	0,00	0,00	0,00	0,50	1,25	16,93	0,50	1,25	0,76
7	0,33	0,83	14,71	0,33	0,83	11,29	0,33	0,83	0,51
8	0,67	1,67	29,41	0,17	0,42	5,64	0,17	0,42	0,25
9	0,17	0,42	7,35	0,67	1,67	22,57	0,17	0,42	0,25
10	0,17	0,42	7,35	0,17	0,42	5,64	0,67	1,67	1,02

¹valor cod.: fração do substrato na mistura. Fonte: o autor (2022).

4.9.1 Ajuste de modelos polinomiais

De posse dos valores de potencial bioquímico de metano e índice de sinergia, resultantes da execução das misturas previstas pelo planejamento centróide simplex, os dados foram ajustados através de modelos polinomiais, a fim de determinar a equação que melhor os representa. Os dados foram ajustados através de regressão pelo método dos mínimos quadrados, utilizando quatro modelos, sendo três polinômios completos (linear, quadrático e cúbico) e um polinômio especial (cúbico especial), apresentados no Quadro 1. As regressões dos modelos também foram realizadas pelo software Statistica 10.0.

Em todos os modelos foram utilizados como entrada as frações em termos de concentração de sólidos voláteis dos substratos biomassa algal, vinhaça e glicerina residual.

Quadro 1 – Modelos polinomiais utilizados no presente trabalho

Modelo	Equação geral
Linear	$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \beta_i x_i$
Quadrático	$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \beta_{ij} x_i x_j$
Cúbico especial	$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{1 \leq i < j < k \leq q} \beta_{ijk} x_i x_j x_k$
Cúbico completo	$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) + \sum_{1 \leq i \leq j \leq k \leq q} \beta_{ijk} x_i x_j x_k$

Fonte: o autor (2022).

Nas equações gerais do Quadro 1, y corresponde à variável dependente ou resposta (PBM ou índice de sinergia), x_i é a proporção do componente i na mistura e β e γ são coeficientes do modelo representando interações em diferentes graus entre os componentes, especificadas abaixo:

β_i : coeficientes dos componentes puros;

β_{ij} : coeficientes das interações binárias entre os componentes;

β_{ijk} : coeficientes das interações ternárias entre três componentes;

γ_{ij} : coeficientes das interações ternárias entre dois componentes.

4.9.2 Figuras de mérito

Após a regressão dos modelos polinomiais e a predição do potencial bioquímico de metano e do índice de sinergia de cada mistura, as figuras de mérito foram calculadas e tomadas como critério de comparação entre os modelos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Inicialmente, para cada modelo foi elaborada a tabela de Análise de Variância (ANOVA). As expressões para os cálculos da ANOVA podem ser encontrados no Quadro 2, onde n_i é o número de repetições autênticas (replicatas) do nível i , j é um segundo índice para identificar as repetições para um mesmo nível, M é o número de níveis distintos da variável independente (neste trabalho, o número de pontos distintos do planejamento), N é o número

total de replicatas ($N = \sum n_i$) e P é o número de parâmetros ou termos do modelo (conforme Quadro 1). Para os cálculos das somas quadráticas da ANOVA são utilizados os valores de y_{ij} (valor da replicata j do nível i), $\bar{y}$ (média geral das respostas experimentais), $\bar{y}_i$ (média das respostas experimentais para o nível i) e $\hat{y}_i$ (valor estimado pelo modelo, para o nível i).

Quadro 2 – Análise de variância para o ajuste pelo método dos mínimos quadrados de um modelo linear nos parâmetros

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum_i^M \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$P - 1$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{P - 1}$
Resíduos	$SQ_{res} = \sum_i^M \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$N - P$	$MQ_{res} = \frac{SQ_{res}}{N - P}$
Falta de ajuste	$SQ_{fal} = \sum_i^M \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$M - P$	$MQ_{fal} = \frac{SQ_{fal}}{M - P}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^M \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$N - M$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{N - M}$
Total	$SQ_T = \sum_i^M \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$N - 1$	-

Fonte: Adaptado de Barros Neto, Scarmínio e Bruns (2010).

A percentagem de variação explicada pelo modelo, ou coeficiente de determinação ajustado, pode ser calculada pela Equação (12). Esse parâmetro, R'^2 (R^2 ajustado), é mais indicado para métodos multivariados e é calculado considerando os graus de liberdade das médias quadrática residual (MQ_{res}) e total (MQ_T).

$$R'^2 = 1 - \frac{MQ_{res}}{MQ_T} \quad (12)$$

A percentagem de variação explicada deve ser comparada à percentagem máxima de variação explicável dos dados, dada pela Equação (13), a qual não depende do modelo. Quanto mais próxima a percentagem explicada for da percentagem máxima explicável, mais ajustado o modelo está.

$$\% \text{ máxima de variação explicável} = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} \quad (13)$$

Ainda com os dados da ANOVA, é possível estimar também a significância estatística da regressão e da falta de ajuste. A estimativa da significância estatística da regressão (F_{reg}), calculada pela Equação (14), é comparada ao valor de $F_{P-1, N-1}$ no nível de confiança α (95%

neste trabalho), onde $P - 1$ e $N - 1$ correspondem aos graus de liberdade da média quadrática da regressão (MQ_{Reg}) e dos resíduos (MQ_{res}), respectivamente. Se F_{Reg} for maior que o valor de $F_{P-1, N-1}$ tabelado, então a regressão do modelo é significativa.

$$F_{Reg} = \frac{MQ_{Reg}}{MQ_{res}} \quad (14)$$

A significância estatística da falta de ajuste (F_{fal}) é calculada pela Equação (15) e comparada ao valor de $F_{M-P, N-M}$ no nível de confiança α , onde $M - P$ e $N - M$ correspondem aos graus de liberdade da média quadrática da falta de ajuste (MQ_{fal}) e do erro puro (MQ_{ep}), respectivamente. Se o modelo não estiver bem ajustado, será obtido um alto valor de F_{fal} , o que evidencia muita falta de ajuste. Portanto, o ideal é que o valor de F_{fal} seja menor que $F_{M-P, N-M}$.

$$F_{fal} = \frac{MQ_{fal}}{MQ_{ep}} \quad (15)$$

Após a análise de significância da regressão e da falta de ajuste, foi elaborado o gráfico de Pareto com os efeitos padronizados de cada termo do modelo. O gráfico de Pareto serve para comparar a importância relativa de cada termo e ordena os efeitos de forma decrescente, de modo que o primeiro efeito é sempre o mais importante. Os termos não significativos a $p = 0,05$ foram excluídos da equação polinomial.

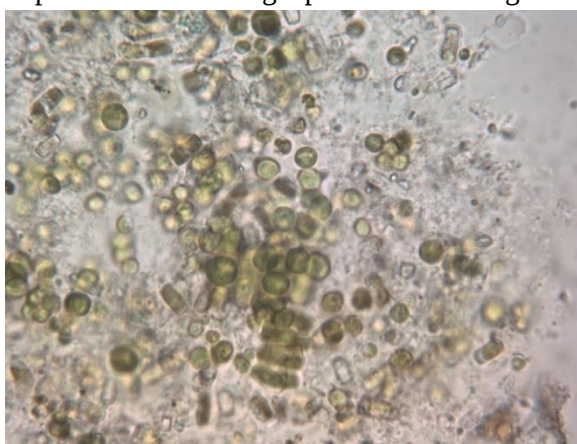
Uma vez otimizado o modelo, foram gerados gráficos de correlação entre os valores estimados e os valores reais obtidos nos experimentos e feita uma avaliação sobre a distribuição normal dos resíduos. Além disso, foram gerados gráficos dos resíduos, que correspondem à diferença entre os valores estimados e os reais, permitindo a avaliação acerca da aleatoriedade deles. Com base na análise desses parâmetros, o melhor modelo foi selecionado para gerar gráficos de contorno e gráficos de superfície, usando o software Statística 10.0. Um gráfico de contorno fornece uma visão bidimensional, onde todos os pontos que têm a mesma resposta são conectados para produzir linhas de contorno de respostas constantes. Um gráfico de superfície fornece uma visão tridimensional que pode fornecer uma imagem mais clara do comportamento da variável avaliada em função de cada combinação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos substratos

A Figura 8 apresenta a imagem microscópica da biomassa algal coletada de uma lagoa de alta taxa e utilizada nos experimentos. A biomassa era composta predominantemente por microalgas do gênero *Chlorella sp.* e pelos gêneros *Cyclotella sp.* e *Desmodesmus sp.* em menor quantidade (SANT'ANNA *et al.* 2012).

Figura 8 – Imagem microscópica da biomassa algal proveniente de lagoa de alta taxa. Magnitude: 100x



Fonte: o autor (2022).

Tabela 9 – Resultados da caracterização da biomassa algal utilizada nos experimentos (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetros	Valores
pH	7,10
DQO total (mg O ₂ .L ⁻¹)	20031 $\pm$ 703
DQO solúvel (mg O ₂ .L ⁻¹)	460 $\pm$ 2
DQOs/DQOt (%)	2,30
Carbono orgânico total (mg.L ⁻¹)	8511,11
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L ⁻¹)	1022 $\pm$ 7
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	56 $\pm$ 2
C/N ¹	8,33
Fósforo total (mg.L ⁻¹)	147,5 $\pm$ 8,4
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	21528 $\pm$ 232
Sólidos totais voláteis (mg.L ⁻¹)	13578 $\pm$ 393
SV/ST (%)	63,07
Cinzas (% ST)	36,93
Lipídeos (% ST)	18,11
Proteínas (% ST)	29,66
Carboidratos (% ST)	15,30

¹C/N: COT/NTK. Fonte: o autor (2022).

Como pode ser observado na Tabela 9, a biomassa algal apresentou baixa relação C/N (8,33) devido ao seu alto teor de nitrogênio (1022 mg.L⁻¹), portanto, a inibição do metabolismo

anaeróbio devido ao acúmulo de amônia é possível, justificando a busca por co-substratos que aumentem a relação C/N dentro do reator. O alto teor de nitrogênio é consequência da alta fração de proteínas na biomassa (29,66%). As frações de carboidratos e lipídeos representaram 15,30 e 18,11% dos sólidos totais, respectivamente. Apenas 2,3% da DQO estava na forma solúvel, ou seja, uma pequena fração de matéria orgânica estava prontamente disponível para degradação microbiana. O pH da biomassa algal apresentou valor neutro e, portanto, adequado para digestão anaeróbia.

Com relação à caracterização da glicerina, o percentual de glicerol aumentou de 40,2% para 54,7, após o processo de purificação, conforme observado na Tabela 10. Destaca-se o alto teor de matéria orgânica deste substrato ($854751 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$, em termos de DQO) frente à baixa concentração de nitrogênio total (NTK), o qual ficou abaixo do limite de detecção da análise.

Tabela 10 – Resultados da caracterização da glicerina residual bruta e após purificação (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetros	Glicerina Bruta	Glicerina purificada
pH	8,9	2,9
Teor de glicerol (% m/m)	40,2	54,7
Densidade absoluta a 20 °C (g/cm^3)	0,998	1
DQO total ($\text{mg O}_2\text{.L}^{-1}$)	1520981 ± 9321	854751 ± 19962
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L^{-1})	ND ¹	ND ¹
Sólidos totais (mg.L^{-1})	555200 ± 10678	421236 ± 32776
Sólidos totais voláteis (mg.L^{-1})	512300 ± 10568	354556 ± 32187
SV/ST (%)	92,27	84,17

¹ND: não detectado. Fonte: o autor (2022).

A Tabela 11 apresenta os dados de caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar.

Tabela 11 – Resultados da caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetros	Valores
pH	4,78
Condutividade elétrica (mS.cm^{-1})	5,19
DQO total ($\text{mg O}_2\text{.L}^{-1}$)	21774 ± 76
Carbono orgânico total (mg.L^{-1})	9251,89
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L^{-1})	222 ± 3
Nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1})	$8,62 \pm 0,33$
C/N ¹	41,68
Fósforo total (mg.L^{-1})	$75,41 \pm 6,47$
Sólidos totais (mg.L^{-1})	23363 ± 269
Sólidos totais voláteis (mg.L^{-1})	17724 ± 215
SV/ST (%)	75,86

¹C/N: COT/NTK. Fonte: o autor (2022).

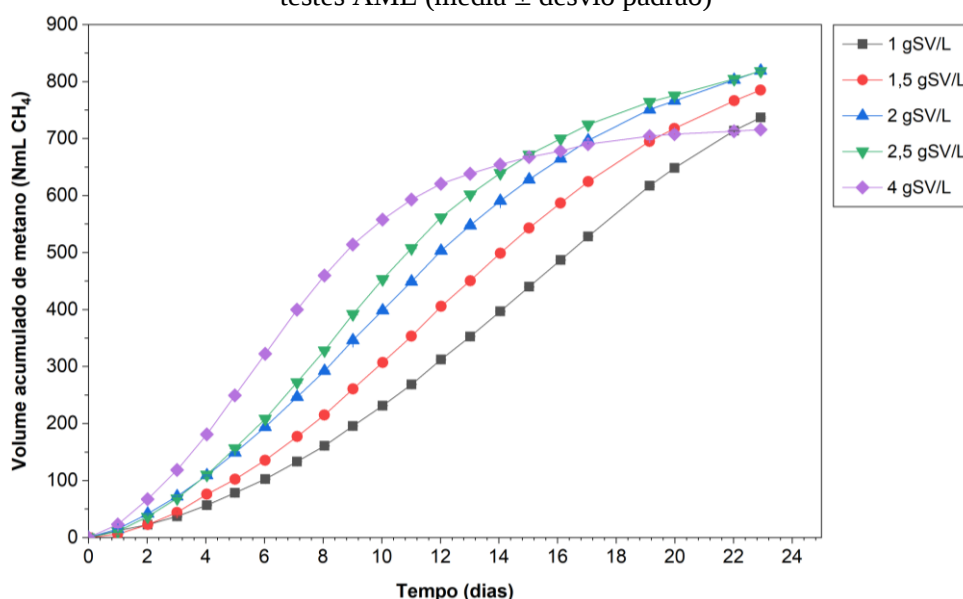
A vinhaça apresentou pH ácido, que é decorrente do emprego de H_2SO_4 no processo de produção do etanol. Este substrato apresentou uma relação C/N de 41,68. Sendo assim, tanto a

glicerina quanto a vinhaça são substratos adequados para co-digestão com a biomassa algal, visando a obtenção de uma relação C/N otimizada para o processo.

5.2 Avaliação do teste de atividade metanogênica específica do lodo

Os resultados dos volumes acumulados de gás metano durante 23 dias de monitoramento para o lodo de cervejaria são apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Produção acumulada de metano para diferentes concentrações do lodo de cervejaria nos testes AME (média $\pm$ desvio padrão)



Fonte: o autor (2022).

A Tabela 12 e a Figura 10 apresentam os resultados dos testes de AME, avaliados para cinco concentrações de lodo e acetato de sódio a uma concentração de 4gDQO.L⁻¹. O cálculo da AME foi feito utilizando-se a faixa linear com maior inclinação (máxima tangente) das curvas de volume acumulado de metano.

Tabela 12 – Valores de atividade metanogênica específica e máxima tangente de produção para cinco concentrações de lodo

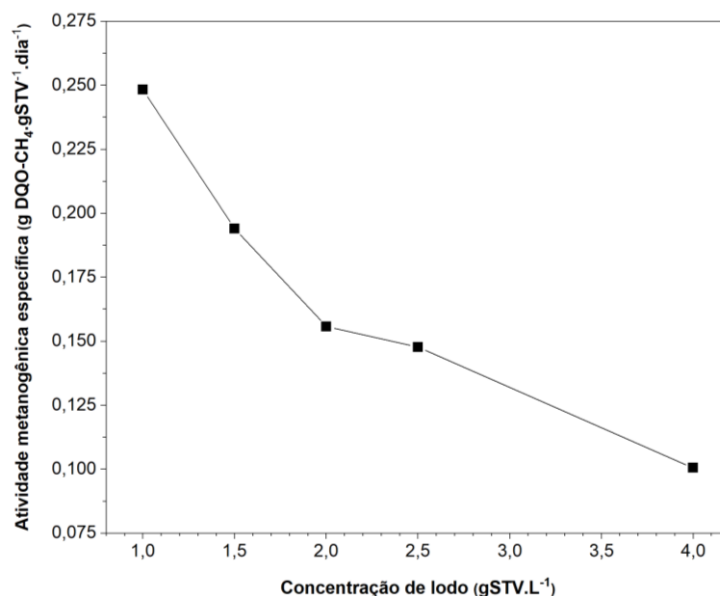
Concentração de lodo (gSV.L ⁻¹)	Máxima tangente (mL CH ₄ .dia ⁻¹)	AME (gDQO-CH ₄ .gSV ⁻¹ .dia ⁻¹)
1,00	43,89	0,25
1,50	51,58	0,19
2,00	55,23	0,16
2,50	65,47	0,15
4,00	71,26	0,10

Fonte: o autor (2022).

Para uma concentração de lodo de 1 gSV.L⁻¹, o valor da AME foi de 0,25 gDQO-CH₄.gSV⁻¹.dia⁻¹, correspondendo à máxima AME obtida dentre as concentrações avaliadas.

Souza (2011) estudou a AME utilizando lodo de cervejaria na concentração de $2,5 \text{ gSV.L}^{-1}$ e um dos substratos sendo acetato, variando-se a concentração de $1,0$ a $2,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$, em temperatura de 37°C . O valor da AME obtido pela autora foi de $0,37 \text{ gDQO-CH}_4.\text{gSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Longaretti *et al.* (2019) também determinaram a atividade metanogênica de um lodo de indústria cervejeira. Os autores utilizaram glicose como substrato a uma concentração de $4,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ e uma concentração de lodo de $5,0 \text{ gSV.L}^{-1}$. A AME obtida foi de $0,33 \text{ gDQO-CH}_4.\text{gSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Por meio dos resultados obtidos neste trabalho – $0,25 \text{ gDQO-CH}_4.\text{gSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para lodo de cervejaria – pode-se afirmar que a atividade metabólica de formação de metano está em um valor aceitável quando comparado aos trabalhos citados.

Figura 10 – AME do lodo de cervejaria para diferentes concentrações da biomassa



Fonte: o autor (2022).

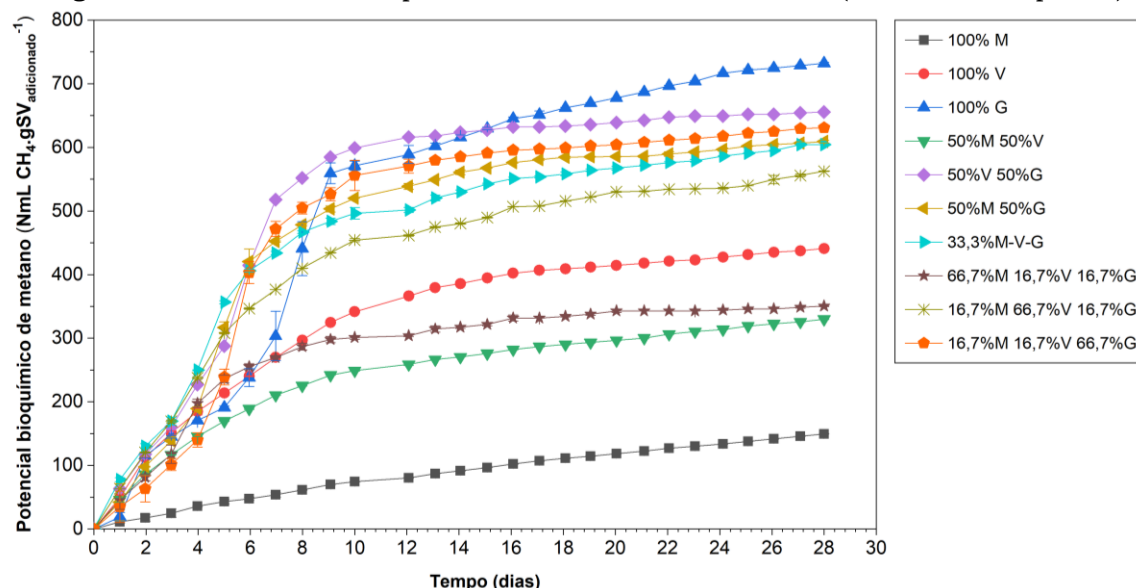
Observa-se na Figura 10 que o valor da AME foi inversamente proporcional à concentração de lodo, comportamento semelhante ao observado por Rocha (2003). Com o aumento da concentração de lodo no reator, provavelmente ocorrem problemas de difusão do substrato por meio do leito de lodo, em decorrência de o teste ter sido realizado sem agitação permanente. Consequentemente, ocorre baixa eficiência na conversão de substrato em biogás (LONGARETTI *et al.*, 2019).

5.3 Testes do potencial bioquímico de metano

As dez misturas avaliadas por meio de testes PBM apresentaram diferentes perfis de produção de metano, e as diferenças entre elas se tornaram mais aparentes ao longo do período experimental, particularmente após os quatro primeiros dias de incubação (Figura 11). Os testes

de PBM diferiram no rendimento final de metano, mas a produção de metano não apresentou fases lag perceptíveis.

Figura 11 – PBM acumulado para as diferentes misturas avaliadas (média $\pm$ desvio padrão)



Fonte: o autor (2022).

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos nos testes de potencial bioquímico de metano, além da relação carbono-nitrogênio (C/N) para todas as dez misturas avaliadas, definidas através da matriz experimental do planejamento centróide simplex.

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

Mistura	% com base em SV			C/N ¹	PBM (NmL CH ₄ .gSV _{ad} ⁻¹)	% CH ₄ ²	Índice de sinergia (IS)	Biodegradabilidade (%)
	M	V	G					
1	100,0	0,0	0,0	8,33	150 $\pm$ 2,8	63,1 $\pm$ 0,7	-	28,97 $\pm$ 0,55
2	0,0	100,0	0,0	41,68	441 $\pm$ 7,5	73,3 $\pm$ 0,4	-	85,02 $\pm$ 1,44
3	0,0	0,0	100,0	-	732 $\pm$ 30,3	60,6 $\pm$ 7,0	-	96,40 $\pm$ 3,99
4	50,0	50,0	0,0	13,09	330 $\pm$ 0,8	70,4 $\pm$ 0,0	1,12 $\pm$ 0,00	63,75 $\pm$ 0,15
5	50,0	0,0	50,0	20,60	609 $\pm$ 37	70,9 $\pm$ 1,2	1,38 $\pm$ 0,08	95,46 $\pm$ 5,80
6	0,0	50,0	50,0	115,29	655 $\pm$ 35	56,4 $\pm$ 1,1	1,10 $\pm$ 0,02	98,59 $\pm$ 1,98
7	33,3	33,3	33,3	23,61	604 $\pm$ 18,1	71,1 $\pm$ 0,6	1,37 $\pm$ 0,04	96,97 $\pm$ 3,02
8	66,7	16,7	16,7	12,61	355 $\pm$ 6,4	69,3 $\pm$ 1,4	1,20 $\pm$ 0,10	59,30 $\pm$ 2,87
9	16,7	66,7	16,7	29,03	563 $\pm$ 38,1	66,4 $\pm$ 5,7	1,28 $\pm$ 0,09	96,03 $\pm$ 6,82
10	16,7	16,7	66,7	55,17	631 $\pm$ 14,1	70,4 $\pm$ 2,7	1,09 $\pm$ 0,02	92,91 $\pm$ 2,08

M: microalga. V: vinhaça. G: glicerina. ¹Estimada a partir das relações C/N de cada substrato.

²Percentual final de metano no biogás. Fonte: o autor (2022).

Como esperado, ao final dos 28 dias de experimento, a biomassa algal apresentou o menor valor de potencial bioquímico de metano, de 150,0 $\pm$ 2,8 NmL CH₄.gSV_{ad}⁻¹, quando digerida individualmente. Microalgas do gênero *Chlorella* sp. são conhecidas por possuírem paredes celulares que impedem a ação de microrganismos responsáveis pela degradação

anaeróbia (MUSSGUG *et al.*, 2010). Comparando com os resultados obtidos por Wang *et al.* (2013) para *Chlorella sp.* (123 NmL CH₄.gSV⁻¹), por Zhen *et al.* (2016) utilizando consórcio de *Scenedesmus sp.* e *Chlorella sp.* (106,9 NmL CH₄.gSV⁻¹) e por Zhang *et al.* (2019) para *C. Vulgaris* (158 NmL CH₄.gSV⁻¹), verifica-se que o resultado obtido no presente estudo foi compatível com tais valores reportados na literatura. No entanto, o rendimento obtido neste trabalho foi inferior aos resultados de Solé-Bundó *et al.* (2017) utilizando biomassa algal coletada em lagoa de alta taxa, com predomínio de *Chlorella sp.* (264 NmL CH₄.gSV⁻¹), por exemplo. Os diferentes rendimentos podem estar associados às diferentes espécies de microalgas utilizadas, bem como às condições experimentais.

A glicerina residual de biodiesel acidificada apresentou o maior rendimento de metano ($732 \pm 30,3$ NmL CH₄.gSV_{ad}⁻¹) dentre os substratos avaliados. Valor semelhante foi encontrado por Amon *et al.* (2006) para glicerina pura (750 NmL CH₄.gSV⁻¹). O alto rendimento de metano da glicerina residual está relacionado ao seu alto nível de biodegradabilidade (SILES LÓPEZ *et al.*, 2009). Por outro lado, o resultado obtido nesta pesquisa foi significativamente maior que outros estudos relatados na literatura, utilizando glicerina residual bruta. González *et al.* (2019) avaliaram o PBM de glicerina na faixa mesofílica (34 °C), e obtiveram um rendimento de 561 NmL CH₄.gSV⁻¹. Neumann *et al.* (2015) também avaliaram o potencial bioquímico de uma glicerina residual de biodiesel, e obtiveram um PBM de 302 NmL CH₄.gSV⁻¹, após 60 dias de experimento. Esta redução nos rendimentos com relação aos resultados obtidos no presente estudo, está relacionada principalmente à presença de impurezas na glicerina residual bruta (metanol, éster etílico, sulfato etc.), além dos diferentes teores de glicerol, sendo responsáveis pela diminuição do rendimento de metano em relação à glicerina purificada (RODRÍGUEZ-ABALDE; FLOTATS; FERNÁNDEZ, 2017).

O PBM da vinhaça de cana-de-açúcar neste estudo ($441 \pm 7,5$ NmL CH₄.gSV_{ad}⁻¹) foi compatível com a faixa de rendimentos relatados na literatura, utilizando vinhaça de cana-de-açúcar (323 NmL CH₄.gSV⁻¹) (PEIXOTO *et al.*, 2012), vinhaça de milho (458 NmL CH₄.gSV⁻¹) (NASR *et al.*, 2012) e vinhaça de mandioca estudada por Wang *et al.* (2011) (311 NmL CH₄.gSV⁻¹).

Como pode ser observado na Tabela 13, os rendimentos de metano obtidos nos testes de co-digestão aumentaram juntamente com o aumento do percentual de glicerina na mistura. Os rendimentos das misturas 5, 7, 9 e 10 foram de 609 ± 37 , $604 \pm 18,1$, $563 \pm 38,1$ e $631 \pm 14,1$ NmL CH₄.gSV_{ad}⁻¹, respectivamente, aumentando em 4,06-, 4,03-, 3,75- e 4,21 vezes do que os testes de microalgas puras. Por outro lado, os menores rendimentos de metano em testes de co-

digestão foram obtidos para as misturas 4 e 8 (M:V:G de 50:50:0 e 66,7:16,7:16,7, respectivamente), resultando em $330 \pm 0,8$ e $355 \pm 6,4$ NmL CH₄.gSV_{ad}⁻¹, respectivamente.

Aumentos dos rendimentos de metano também foram obtidos por Li *et al.* (2017), que realizaram testes de co-digestão de *Chlorella sp.* e esterco de galinha. Os testes foram realizados sob condição mesofílica (35° C), relação substrato/inóculo (S/I) de 0,5 gSV.gSV⁻¹ e agitação manual diária. A substituição de 20% em sólidos voláteis (SV) de esterco de galinha por biomassa de *Chlorella sp.* resultou em aumentos dos rendimentos de metano de 14,2 e 76,9%, quando comparados à digestão individual de esterco de galinha e *Chlorella sp.*, respectivamente. Testes de co-digestão de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* com resíduos de alimentos, realizados por Zhen *et al.* (2016), também apresentaram resultados positivos. Dentre as proporções avaliadas, o maior rendimento específico de metano (640 NmL CH₄.gSV⁻¹) foi obtido a partir de uma razão microalgas/resíduos de alimentos de 0,2/0,8. Com relação ao rendimento da digestão individual das microalgas, este resultado foi cerca de 5 vezes maior.

O teste de digestão utilizando apenas biomassa algal apresentou a menor biodegradabilidade dentre as misturas avaliadas ($28,97 \pm 0,55$ %). Este resultado foi um pouco menor do que o relatado por Wang *et al.* (2016) para *Chlorella sp.* (41%). Apesar da diferença, em geral, a conversão de biomassa algal bruta em metano é geralmente incompleta, não excedendo 50% do potencial teórico de produção (KLASSEN *et al.*, 2016), principalmente em função da resistência da parede celular. Por outro lado, a biodegradabilidade da vinhaça de cana-de-açúcar e da glicerina foram de $85,02 \pm 1,44\%$ e $96,4 \pm 3,99\%$, respectivamente. Nos testes de co-digestão, a biodegradabilidade foi aumentada em todas as misturas, com relação aos testes com microalgas apenas, chegando a valores próximos de 100%, nas misturas M:V:G de 50:0:50 e 33,3:33,3:33,3, por exemplo.

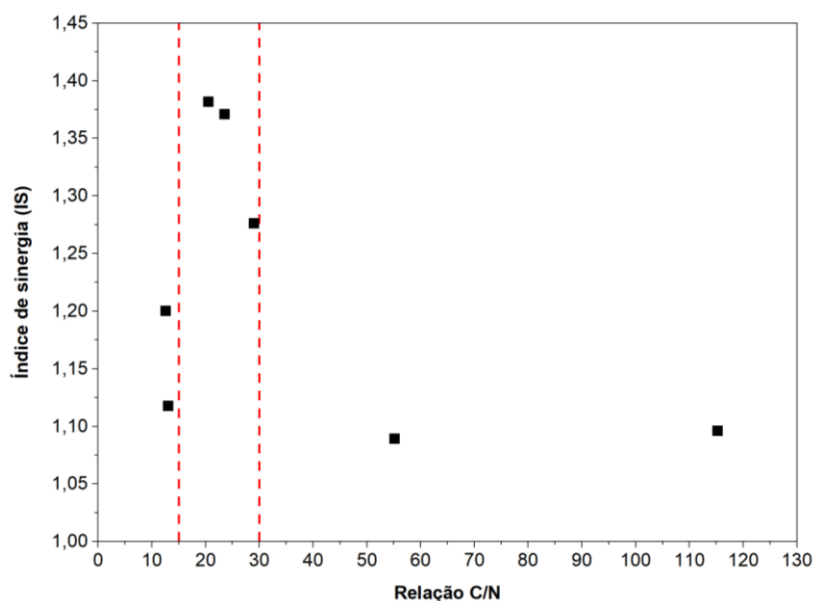
As concentrações de metano no biogás variaram entre $56,4 \pm 1,1\%$ e $73,3 \pm 0,4\%$ para a co-digestão M:V:G de 0:50:50 e digestão individual da vinhaça, respectivamente. É possível observar que o biogás das misturas de co-digestão envolvendo biomassa algal apresentou maiores concentrações de metano com relação à digestão da biomassa pura, evidenciando o efeito sinérgico obtido nas misturas avaliadas. O teor de metano é um dos principais parâmetros em processos de digestão anaeróbia, onde altos níveis de CH₄ no biogás indicam um processo de digestão eficiente, demandando menores custos de purificação. Além disso, o alto teor de metano em um digestor anaeróbio indica um equilíbrio constante da formação de metano e dióxido de carbono. Por outro lado, o baixo teor de metano implica alguma forma de inibição

que diminui a atividade metanogênica dentro do consórcio microbiano (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; KOLESÁROVÁ *et al.*, 2011).

Para estudar os efeitos sinérgicos produzidos pela co-digestão de biomassa algal, vinhaça e glicerina residual, os rendimentos teóricos das misturas de co-digestão foram calculados com base na Equação (4). Conforme observado na Tabela 13, para todas as misturas (4 a 10), o índice de sinergia foi maior do que 1, indicando que houve um aumento dos rendimentos de metano quando comparados aos rendimentos teóricos estimados. O maior índice de sinergia foi obtido para a mistura 5 (50:0:50 de M:V:G, respectivamente), de 1,38, ou seja, a mistura 5 apresentou um aumento de 38% no valor do PBM, comparando com o rendimento teórico. Em seguida está a mistura 7, que obteve um índice de sinergia de 1,37. A sinergia observada nos testes de co-digestão foi atribuída às maiores relações C/N obtidas através da mistura dos substratos, que supostamente favoreceram a atividade microbiana.

A Figura 12 apresenta os valores dos índices de sinergia em função da relação C/N de cada mistura de co-digestão. As linhas verticais em vermelho representam a faixa ótima da relação C/N (15-30), comumente relatada na literatura como ideal para o desempenho de processos de digestão anaeróbia (EHIMEN *et al.*, 2011; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

Através da Figura 12 é possível observar que os maiores índices de sinergia neste estudo foram obtidos quando a relação C/N da mistura variou entre 20,6 e 29, sendo compatível com a faixa relatada como ideal. Isso está de acordo com outros estudos que encontraram maiores sinergias quando valores da relação C/N estavam inseridos na faixa de 20 a 30. Por exemplo, Yen e Brune (2007) observaram que quando adicionados resíduos de papel (50% com base em SV) à biomassa algal, o rendimento de metano foi aumentado em 50%, correspondendo a uma relação C/N entre 20-25, enquanto Hassan *et al.* (2016) relataram a relação C/N de 20 como ótima para a co-digestão de palha de trigo e esterco de galinha. Relações C/N inferiores a 20 levam a uma potencial inibição devido à presença de amônia livre, enquanto razões C/N superiores a 30 podem levar a potenciais limitações de nitrogênio (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Figura 12 – Índice de sinergia em função da relação C/N das misturas

Fonte: o autor (2022).

5.3.1 Avaliação da estabilidade dos testes

No presente estudo, foram avaliados parâmetros físico-químicos antes e após finalização dos testes de PBM. Os parâmetros avaliados foram o pH, alcalinidade total e parcial, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos voláteis totais (AGV), DQO solúvel e série de sólidos.

A Tabela 14 apresenta os valores de pH, AGVs totais, alcalinidade total e parcial, iniciais e após 28 dias, com a finalização dos testes.

Tabela 14 – pH (média $\pm$ desvio padrão), ácidos graxos voláteis e alcalinidade dos reatores

Mistura	% com base em SV			pH		AGV total (mg. L ⁻¹)		Alcalinidade total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)		Alcalinidade parcial (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	
	M	V	G	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	100,0	0,0	0,0	7,88 $\pm$ 0	7,34 $\pm$ 0	57,53	ND ¹	2755,0	3034,6	2170,0	2447,7
2	0,0	100,0	0,0	7,89 $\pm$ 0,02	7,24 $\pm$ 0,02	48,98	ND ¹	2508,3	3276,3	1990,0	2671,5
3	0,0	0,0	100,0	8,04 $\pm$ 0,02	7,52 $\pm$ 0	10,57	ND ¹	3185,0	3434,6	2700,0	2791,7
4	50,0	50,0	0,0	7,89 $\pm$ 0,01	7,31 $\pm$ 0	103,63	ND ¹	2510,0	3206,0	1976,7	2562,0
5	50,0	0,0	50,0	7,96 $\pm$ 0	7,34 $\pm$ 0,03	21,10	ND ¹	2860,0	3371,5	2371,7	2748,9
6	0,0	50,0	50,0	7,93 $\pm$ 0	7,36 $\pm$ 0,02	10,22	ND ¹	2815,0	3403,6	2328,3	2796,5
7	33,3	33,3	33,3	7,92 $\pm$ 0,01	7,3 $\pm$ 0,01	43,25	ND ¹	2771,7	3258,4	2233,3	2560,8
8	66,7	16,7	16,7	7,95 $\pm$ 0,01	7,3 $\pm$ 0,01	67,68	ND ¹	2713,3	3277,4	2126,7	2648,9
9	16,7	66,7	16,7	7,93 $\pm$ 0,02	7,29 $\pm$ 0,04	45,95	ND ¹	2591,7	3340,5	2096,7	2721,5
10	16,7	16,7	66,7	7,99 $\pm$ 0,02	7,33 $\pm$ 0,06	15,72	ND ¹	2968,3	3104,8	2411,7	2485,8

M: microalga. V: vinhaça. G: glicerina. ¹ND: não detectado (<4,4 mg. L⁻¹). Fonte: o autor (2022).

O pH final das misturas variou entre 7,24 $\pm$ 0,02 e 7,52 $\pm$ 0,00. Os microrganismos produtores de metano têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,6 e 7,4, embora seja

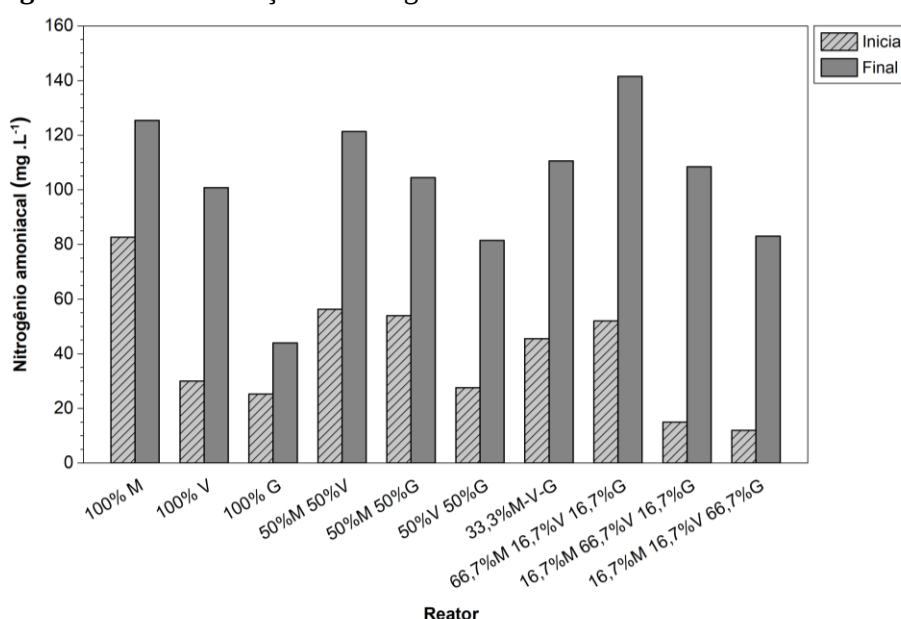
possível conseguir estabilidade numa faixa mais ampla de pH, entre 6,0 e 8,0 (CHERNICHARO, 2016).

Adicionalmente, as concentrações de ácidos graxos voláteis totais ficaram abaixo do limite de detecção em todos os casos ($<4,4 \text{ mg. L}^{-1}$), após 28 dias. Segundo Wang *et al.* (1999), a concentração de AGV's é um parâmetro eficiente para indicar instabilidade do processo anaeróbio, pois o acúmulo destes ácidos no sistema indica que eles não estão sendo convertidos a metano na mesma proporção em que estão sendo produzidos. Sendo assim, as baixas concentrações de AGV's observadas nos reatores indicam que não houve ocorrências de instabilidades durante o período de operação.

As alcalinidades total e parcial sofreram um ligeiro aumento após finalização dos testes, indicando que o sistema apresentou boa capacidade de tamponamento. O efeito tampão se deve em parte à adição inicial de bicarbonato de sódio, enquanto o aumento da alcalinidade foi atribuído principalmente à amonificação do nitrogênio total dos substratos, que leva à formação de bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3).

Em relação ao nitrogênio amoniacal, foi observado um aumento da sua concentração em todos os reatores (Figura 13). A maior concentração no início dos testes ($82,6 \text{ mg.L}^{-1}$) foi obtida para digestão pura de biomassa algal. Após 28 dias, o maior valor foi observado no reator contendo a mistura 8 (M:V:G de 66,7:16,7:16,7), que apresentou uma concentração de nitrogênio amoniacal de $141,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Figura 13 – Concentração de nitrogênio amoniacal inicial e final das misturas

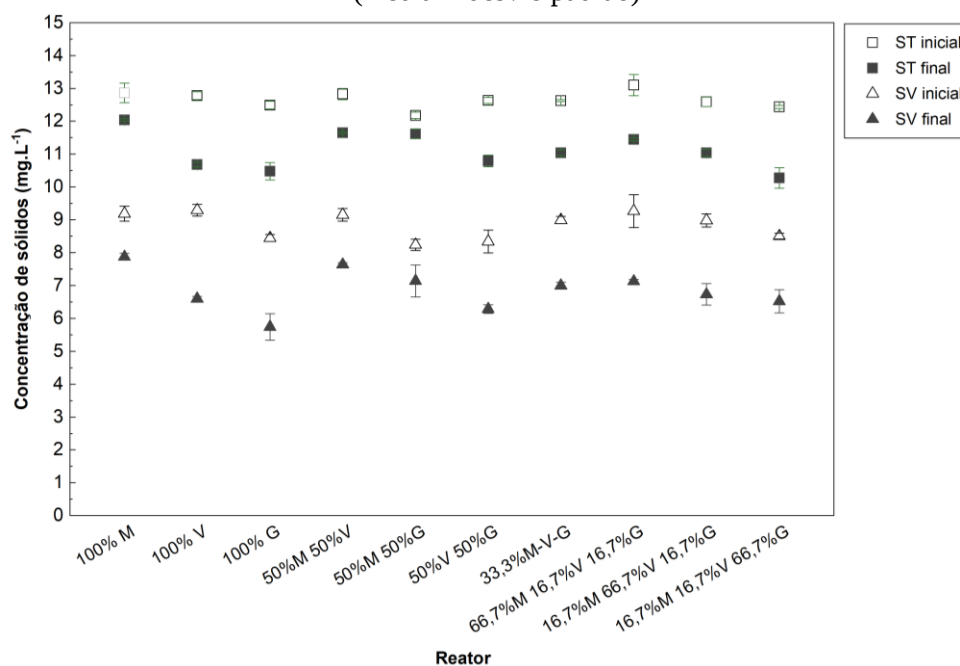


Fonte: o autor (2022).

O aumento observado está associado à digestão de compostos proteicos durante o processo, liberando a amônia para o meio líquido. Além disso, os reatores que apresentaram menores relações C/N, foram, em geral, os que tiveram maior concentração de amônia com o fim dos testes.

O teor de sólidos inicial e final foi avaliado para as diferentes combinações entre os substratos e os resultados estão apresentados na Figura 14.

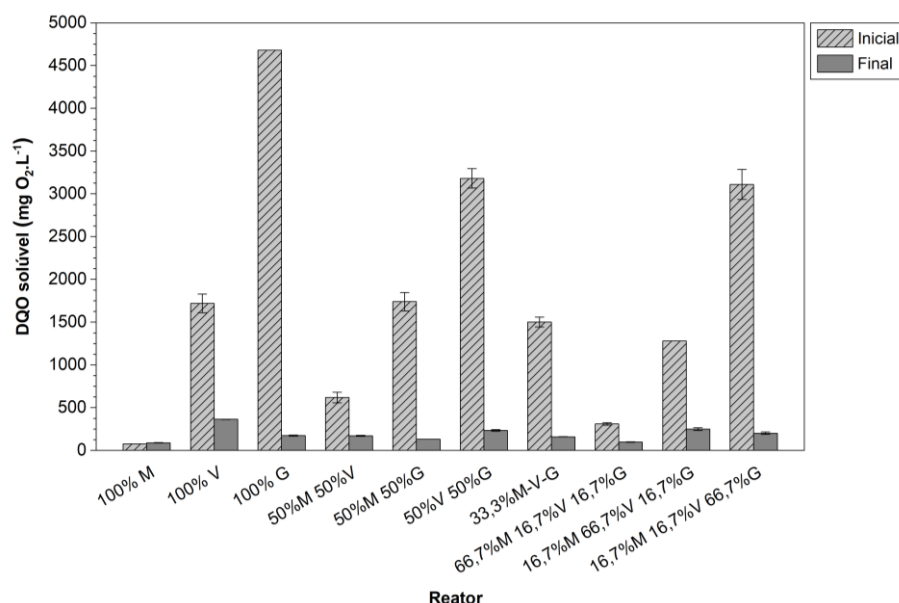
Figura 14 – Concentração de sólidos totais e voláteis iniciais e finais das misturas (média $\pm$ desvio padrão)



Fonte: o autor (2022)

A remoção de sólidos é um indicador bastante útil que reflete a eficiência geral da digestão em um sistema anaeróbio. As maiores concentrações de sólidos total (ST) e sólidos voláteis (SV) após finalização dos testes foram observadas no reator contendo apenas biomassa algal, indicando a baixa biodegradabilidade destes microrganismos (Figura 15). A concentração final de SV no reator contendo apenas microalgas foi de $7,35 \pm 0,10$ mg.L⁻¹, valor consideravelmente maior do que o observado no reator contendo a mistura 6 (M:V:G de 0:50:50), de $5,87 \pm 0,12$ mg.L⁻¹.

A concentração de DQO solúvel (DQOs) também foi determinada nos reatores, e os resultados estão apresentados na Figura 15. Observa-se que o reator contendo apenas microalgas apresentou valores muito baixos de DQOs, antes e após finalização dos testes. Por outro lado, a mistura contendo apenas glicerina apresentou a maior concentração inicial ($4679,7$ mg O₂.L⁻¹), caindo para $363,3 \pm 2,1$ mg O₂.L⁻¹, aos 28 dias.

Figura 15 – Concentração de DQO solúvel inicial e final das misturas (média $\pm$ desvio padrão)

Fonte: o autor (2022).

Os diferentes conteúdos de DQOs nas misturas, implicam em diferentes cinéticas de produção de metano, em função do conteúdo orgânico que estava prontamente disponível para degradação. Isto pode ser confirmado através dos valores da constante de hidrólise de primeira ordem (k) obtidos, apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores da constante de hidrólise de primeira ordem obtido através da modelagem da produção de metano

Mistura	% com base em SV			k (dia ⁻¹)	R ²	TDH (dias)
	Microalga	Vinhaça	Glicerina			
1	100,0	0,0	0,0	0,069	0,992	14,45
2	0,0	100,0	0,0	0,161	0,998	6,23
3	0,0	0,0	100,0	0,166	0,888	6,01
4	50,0	50,0	0,0	0,100	0,977	9,99
5	50,0	0,0	50,0	0,162	0,995	6,18
6	0,0	50,0	50,0	0,218	0,936	4,59
7	33,3	33,3	33,3	0,115	0,969	8,67
8	66,7	16,7	16,7	0,121	0,961	8,25
9	16,7	66,7	16,7	0,113	0,963	8,83
10	16,7	16,7	66,7	0,183	0,971	5,46

Fonte: o autor (2022).

O menor valor de k foi obtido através da digestão individual de biomassa algal (0,069 dia⁻¹), em função da resistência da parede celular destes microrganismos, o que torna a etapa de hidrólise limitante do processo. Consequentemente, o TDH estimado para digestão anaeróbia da biomassa algal foi o maior, de 14,45 dias. Por outro lado, os testes de co-digestão apresentaram maiores valores de constante cinética e menores de TDH. Dessa forma, além da sinergia obtida com a mistura dos substratos, observa-se uma redução significativa do tempo

necessário para estabilização da matéria orgânica, quando comparamos à digestão pura de microalgas.

5.4 Planejamento de misturas centróide simplex

5.4.1 Ajuste dos modelos polinomiais para o PBM

Os valores experimentais de potencial bioquímico de metano foram ajustados utilizando diferentes modelos (linear, quadrático, cúbico especial e cúbico completo) e os parâmetros estatísticos foram analisados para determinação do modelo que mais se ajusta aos dados experimentais. A Tabela 16 resume os parâmetros estatísticos para cada modelo avaliado.

Tabela 16 – Resumo dos parâmetros estatísticos dos modelos polinomiais otimizados para avaliação do potencial bioquímico de metano

Modelo	F_{Reg}	F_{faj}	R^2	R'^2	valor-p
Linear	57,3849	9,3974	0,8710	0,8558	0,000
Quadrático	67,8383	3,2160	0,9604	0,9462	0,001
Cúbico especial	53,2487	4,3222	0,9609	0,9462	0,679
Cúbico completo	47,0100	6,6927	0,9716	0,9509	0,173

Fonte: o autor (2022).

A variação máxima explicável para os dados, a qual independe de qualquer que seja o modelo ajustado, é de 98,30%. Quanto mais próxima a percentagem explicada for da percentagem máxima explicável, mais ajustado o modelo está.

O valor de R'^2 , ajustado pelos graus de liberdade da regressão e total, apresentou o maior valor para o modelo cúbico completo, de 0,9509, o que significa que a regressão da equação permite explicar 95,09% da variação total em torno da média, ficando apenas 4,91% da variação para os resíduos. Este valor de R'^2 pode ser considerado bastante significativo, uma vez que a variação máxima explicável para os dados é de 0,9830. No entanto o valor- p do modelo foi de 0,173, ficando acima do nível de significância ($p > 0,05$).

Após avaliação da significância estatística, a equação quadrática foi selecionada para modelar os gráficos de resposta do potencial bioquímico de metano. Na Tabela 17, é apresentada a ANOVA do ajuste da equação quadrática. A equação quadrática obteve a maior significância estatística da regressão entre os modelos. O valor de F_{Reg} para esta equação foi $F_{Reg} = 67,84$, enquanto o valor crítico, a 95% de confiança, é $F_{4,15} = 3,06$.

Tabela 17 – ANOVA do ajuste pelos mínimos quadrados da equação quadrática para o potencial bioquímico de metano

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	569647,3	4	142411,8
Resíduos	26466,9	15	1764,5
Falta de ajuste	16318,5	5	3263,7
Erro puro	10148,4	10	1014,8
Total	596114,2	19	31374,4

Fonte: o autor (2022).

Uma vez que $F_{Reg} > F_{4,15}$, pode-se confirmar que a regressão foi estatisticamente significativa. Com relação à significância estatística da falta de ajuste, esta foi de $F_{faj} = 3,22$ para o modelo quadrático, valor menor que o crítico a 95% de confiança ($F_{5,10} = 3,33$), evidenciando que o modelo está bem ajustado.

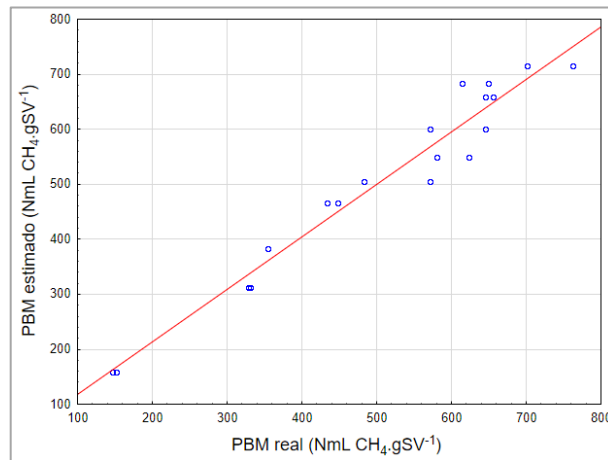
Tendo em vista que, dentre os modelos avaliados, o modelo quadrático foi aquele que apresentou maior F_{Reg} , além de ter sido o único que apresentou ajuste de modelo, utilizou-se esta equação para representação dos dados do PBM. Para este modelo, foi obtido um coeficiente de determinação ajustado de $R'^2 = 0,9462$ ($p = 0,001$), o que significa que a regressão consegue explicar 94,62% da variação total em torno da média. Restou apenas 5,38% de variação para os resíduos.

Adicionalmente, a adequação dos modelos de regressão foi avaliada por meio da análise dos resíduos, considerando a diferença entre os valores determinados experimentalmente e os valores estimados. Os gráficos de probabilidade normal dos resíduos são usados para verificar a normalidade dos dados. Esta é uma técnica gráfica para avaliar se os dados são normalmente distribuídos ou não (RAO; BARAL, 2011).

O gráfico da Figura 16 correlaciona os valores estimados pela equação quadrática em função dos valores reais de potencial bioquímico de metano, para as 20 replicatas. Pode-se observar que os pontos experimentais estão alinhados através de uma reta, sugerindo distribuição normal.

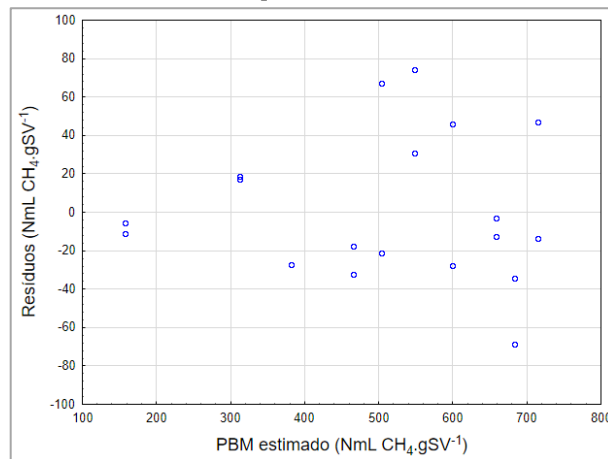
Além disso, os resíduos estavam razoavelmente dispersos aleatoriamente em torno do zero, o que significa que os erros estão tendo uma variância constante, conforme observado na Figura 17.

Figura 16 – Correlação entre os valores de PBM previstos pela equação quadrática em função dos valores reais



Fonte: o autor (2022).

Figura 17 – Distribuição dos resíduos em função dos valores de PBM estimados pela equação quadrática



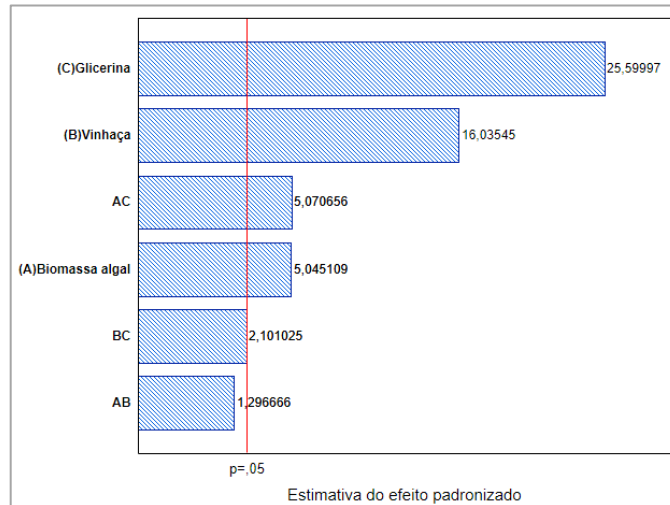
Fonte: o autor (2022).

Além dos termos puros, a equação do modelo apresenta termos quadráticos, totalizando 6 componentes. Substituindo-se os coeficientes da regressão na equação quadrática do Quadro 1, obtém-se a equação (16), onde y_{PBM} representa o valor do potencial bioquímico de metano (PBM) estimado pela equação, e os componentes A , B e C são as frações, em termos de sólidos voláteis (SV), dos substratos biomassa algal, vinhaça e glicerina, respectivamente.

$$y_{PBM} = 141,35A + 449,26B + 717,23C + 167,43AB + 654,75AC + 271,30BC \quad (16)$$

Os efeitos padronizados de cada componente da equação quadrática foram utilizados para elaborar o gráfico de Pareto da Figura 18, no qual a linha vermelha ($p = 0,05$) representa o valor crítico de t_{15} . Os termos estão ordenados de forma decrescente do valor absoluto do efeito padronizado.

Figura 18 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados dos componentes da equação quadrática obtida pelo PBM das misturas de biomassa algal, vinhaça e glicerina



Fonte: o autor (2022).

No gráfico de Pareto, todos os termos que estão acima do valor de p , representado pela linha vermelha, são significativos para o modelo. Os termos que estão abaixo de p não são significativos e podem ter seu efeito ignorado. Este é o caso do termo AB, cujo efeito foi inferior ao p calculado para 15 graus de liberdade (dos resíduos). Todos os outros 5 termos do modelo têm efeitos significativos e serão mantidos.

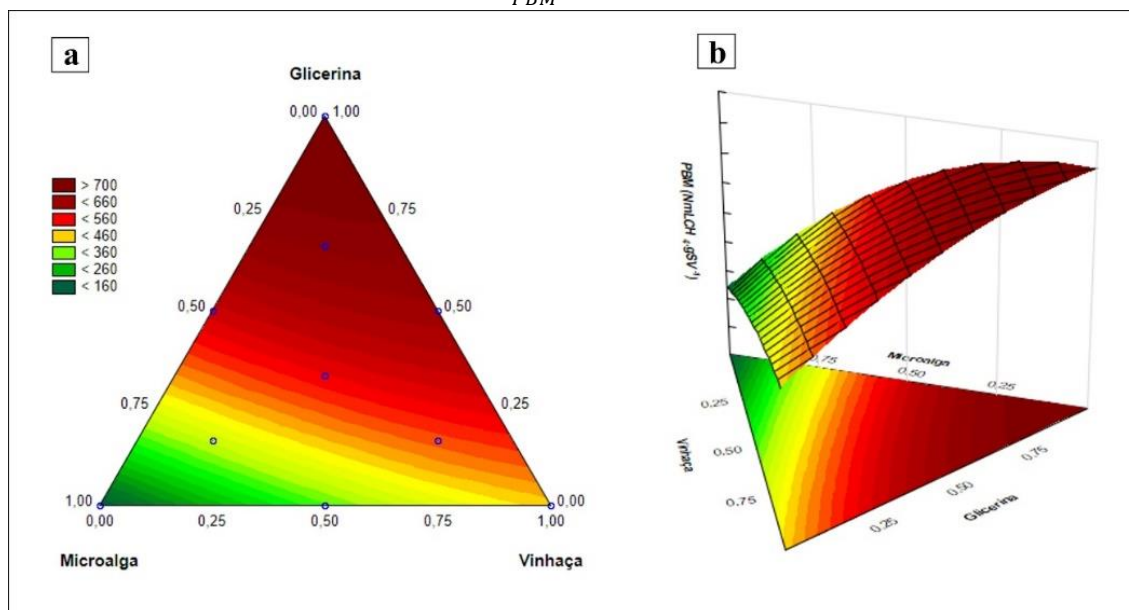
Os coeficientes de cada termo representam a mudança esperada na resposta do processo, portanto, coeficientes positivos sozinhos ou para alguns termos de interação indicam que os substratos têm influência positiva ou foram complementares em sua influência na produção de metano (LUNA-AVELAR *et al.*, 2021). Observa-se pela equação (16) que todos os substratos utilizados nas misturas têm efeitos positivos no valor do y_{PBM} . Os termos lineares A, B e C foram altamente significativos ($p < 0,0001$). A glicerina residual teve a maior contribuição para o PBM do modelo quadrático, seguida da vinhaça. Isto se deve principalmente à maior biodegradabilidade destes substratos, em relação à biomassa algal, por exemplo. Dentre os termos quadráticos, a interação de biomassa algal e glicerina (AC) foi a que apresentou o maior efeito sinérgico, além de ter sido altamente significativa ($p < 0,0001$).

Após eliminação do termo AB, o qual apresentou-se insignificante para o modelo, a equação quadrática otimizada pode ser reescrita da seguinte forma:

$$y_{PBM} = 141,35A + 449,26B + 717,23C + 654,75AC + 271,30BC \quad (17)$$

A Figura 19 apresenta os gráficos de contorno (a) e de superfície (b) para os valores de y_{PBM} estimados pela equação quadrática.

Figura 19 – Gráficos de resposta para o y_{PBM} : (a) mapa de contorno. (b) superfície de resposta



Fonte: o autor (2022).

5.4.2 Ajuste dos modelos polinomiais para o índice de sinergia

Assim como foi feito para o PBM, os valores experimentais do índice de sinergia foram ajustados utilizando diferentes modelos (linear, quadrático, cúbico especial e cúbico completo). A Tabela 18 resume os parâmetros estatísticos para cada modelo avaliado.

Tabela 18 – Resumo dos parâmetros estatísticos dos modelos polinomiais otimizados para avaliação do índice de sinergia

Modelo	F_{Reg}	F_{faj}	R^2	R'^2	valor-p
Linear	0,1011	14,6450	0,0118	0,0000	0,904
Quadrático	6,2311	6,3250	0,6900	0,5792	0,001
Cúbico especial	4,9870	8,1620	0,6971	0,5573	0,589
Cúbico completo	9,7955	4,0140	0,8769	0,7874	0,007

Fonte: o autor (2022).

Dentre os modelos avaliados, pode-se observar que o modelo cúbico completo foi o que apresentou o maior valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8769$). Para este modelo, foi obtido um coeficiente de determinação ajustado de $R'^2 = 0,7874$, em comparação com a variação máxima explicável de 91,21%, independentemente da regressão. Os resultados da ANOVA para o modelo cúbico completo estão apresentados na Tabela 19.

A significância da regressão para o modelo cúbico completo foi a maior dentre os modelos avaliados ($F_{Reg} = 9,796$), além de ter apresentado valor maior que o crítico ($F_{8,11} =$

2,95) a 95% de confiança. Além disso, a equação cúbica completa também apresentou ajuste de modelo a 95% de confiança ($F_{faj} = 4,014$; $F_{1,10} = 4,96$), uma vez que $F_{faj} < F_{1,10}$.

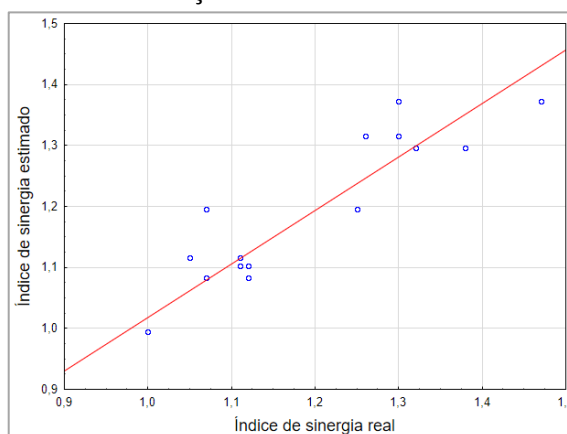
Tabela 19 – ANOVA do ajuste pelos mínimos quadrados da equação cúbica completa para o índice de sinergia

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	0,3629	8	0,0454
Resíduos	0,0509	11	0,0046
Falta de ajuste	0,0146	1	0,0146
Erro puro	0,0364	10	0,0036
Total	0,4139	19	0,0218

Fonte: o autor (2022).

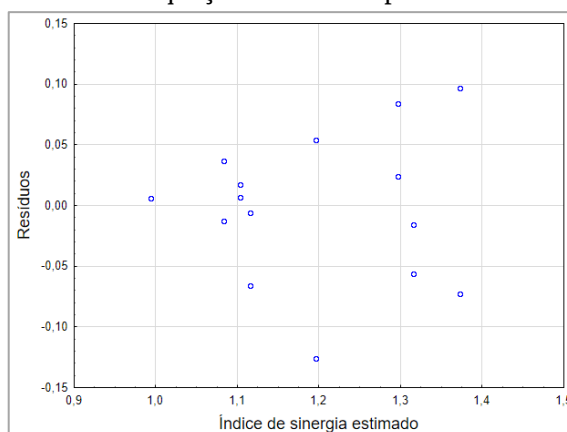
A partir da Figura 20 é possível observar que os pontos experimentais estão razoavelmente alinhados, o que sugere uma distribuição normal e os resíduos apresentaram dispersão aleatória em torno do zero, o que significa que os erros apresentaram uma variância constante (Figura 21).

Figura 20 – Correlação entre os valores do índice de sinergia pela equação cúbica completa em função dos valores reais



Fonte: o autor (2022).

Figura 21 – Distribuição dos resíduos em função dos valores do índice de sinergia estimados pela equação cúbica completa



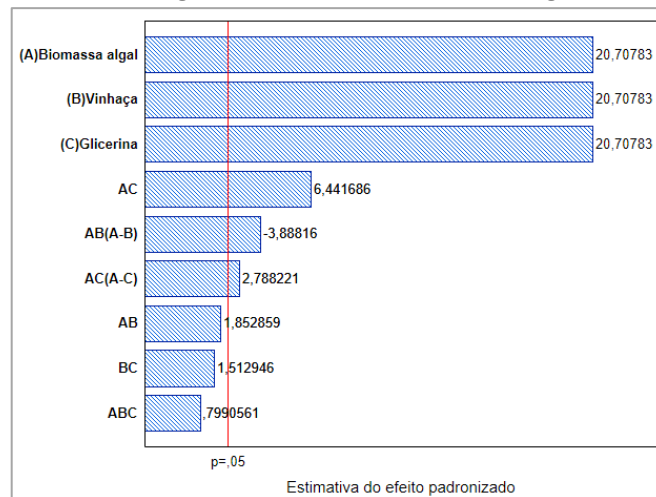
Fonte: o autor (2022).

A equação cúbica completa apresentou nove termos de interação. A Equação (18) apresenta a expressão obtida através do modelo cúbico completo, onde y_{IS} é a resposta prevista pelo modelo para o índice de sinergia das misturas entre biomassa algal, vinhaça e glicerina.

$$y_{IS} = 0,994A + 0,994B + 0,994C + 0,436AB + 1,51608AC + 0,356BC + 1,23ABC - 3,04AB(A - B) + 2,18AC(A - C) \quad (18)$$

Observando-se o gráfico de Pareto com os efeitos dos termos da equação cúbica completa, na Figura 22, pode-se constatar que 3 termos da equação não são significativos para o modelo (todos que estão abaixo de $p = 0,05$). Dos 6 termos que restaram, dois representam interações cúbicas entre os componentes e um representa interação quadrática, além dos três componentes puros.

Figura 22 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados dos componentes da equação cúbica completa obtida pelo índice de sinergia das misturas de biomassa algal, vinhaça e glicerina



Fonte: o autor (2022).

Os efeitos lineares de A, B e C foram altamente significativos para equação ($p < 0,0001$). O termo de interação quadrática, ou seja, AC, também apresentou $p < 0,0001$, além de ter apresentado coeficiente positivo. Isto indica que a mistura entre biomassa algal e glicerina residual do biodiesel apresentou fortes efeitos sinérgicos, ou seja, esta interação proporciona maiores valores de y_{SI} . Além disso a interação AC(A-C) também foi significativa para o modelo ($p < 0,05$). Por outro lado, o termo de interação cúbica, AB(A-B), apesar de ter sido significativo para o modelo ($p < 0,05$), apresentou coeficiente negativo.

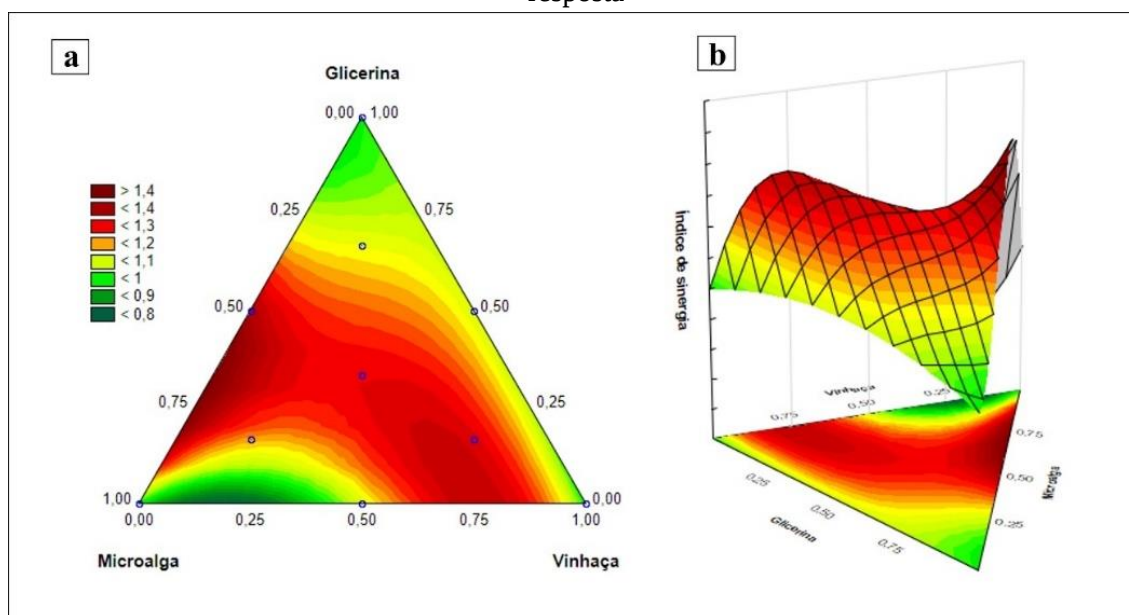
Após exclusão dos termos insignificantes para o modelo, a equação cúbica completa otimizada pode ser expressa da seguinte forma:

$$y_{IS} = 0,99A + 0,99B + 0,99C + 1,52AC - 3,04AB(A - B) + 2,18AC(A - C) \quad (19)$$

A Figura 23 apresenta os gráficos de contorno (a) e de superfície (b) para os valores de y_{IS} (índice de sinergia) estimados pela equação cúbica completa.

Observa-se na Figura 23 que a superfície de resposta se apresenta em forma de sela. Isso indica uma interdependência significativa entre as variáveis independentes do modelo (KIM; KIM; LEE, 2019).

Figura 23 – Gráficos de resposta para o índice de sinergia (y_{IS}): (a) mapa de contorno (b) superfície de resposta



Fonte: o autor (2022).

A região de maior resposta ocorre ao longo do eixo A-C (biomassa algal-glicerina), correspondendo ao coeficiente positivo dos termos AC e AC(A-C) da Equação (19). A região de menor resposta ocorre no eixo A-B, para misturas contendo maiores frações de biomassa algal e menores de vinhaça, refletindo o coeficiente negativo do termo AB(A-B). Por outro lado, quando adicionadas frações maiores de vinhaça, o modelo prevê altos valores de índice de sinergia, indicando serem benéficas misturas nestas condições.

5.4.3 Otimização do potencial bioquímico de metano e do índice de sinergia

O principal objetivo deste estudo foi elaborar uma estratégia de co-digestão eficiente que maximizasse o rendimento de metano a partir de mistura de biomassa algal com vinhaça de cana-de-açúcar e glicerina residual do biodiesel, através da execução de um número mínimo de misturas. As composições da mistura dos substratos que maximiza o potencial bioquímico de metano e o índice de sinergia foram avaliadas através da maximização ou minimização dos

termos de interação das equações quadrática e cúbica completa, respectivamente. Os resultados para as razões de misturas otimizadas estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados otimizados do potencial bioquímico de metano e índice de sinergia através do planejamento centróide simplex

Variável	Valor	Razão % (M:V:G)
Máximo índice de sinergia	1,49	69,7:0:30,3
Máximo PBM	719,60	0:0:100

Fonte: o autor (2022).

O máximo índice de sinergia (1,49) foi previsto para mistura M:V:G de 69,7:0:30,3, enquanto o PBM máximo de 719,60 NmL CH₄.gSV_{ad}⁻¹ foi previsto para digestão individual de glicerina. Apesar dos resultados otimizados apresentarem apenas a presença de biomassa algal e glicerina residual na mistura, observou-se que a adição de aproximadamente 76% de vinhaça de cana-de-açúcar à biomassa algal, em termos de sólidos voláteis, proporcionaria um índice de sinergia de 1,36, ou seja, nestas condições, o rendimento de metano poderia alcançar valor 36% maior que o esperado.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

6.1 Conclusões

- A co-digestão de biomassa algal com vinhaça de cana-de-açúcar e glicerina residual de biodiesel foi, em geral, bem-sucedida e permitiu uma melhora nos parâmetros de estabilidade e eficiência dos reatores.
- A biomassa algal apresentou baixo rendimento de metano ($150,0 \pm 2,8 \text{ NmL CH}_4.\text{gSV}_{\text{ad}}^{-1}$), quando digerida apenas na presença de inóculo e alcalinizante. Com relação à digestão individual de biomassa algal, a adição de co-substratos ao reator proporcionou aumentos de até 4,2 vezes no rendimento de metano, na mistura M:V:G de 16,7:16,7:66,7, em termos de sólidos voláteis.
- Conforme esperado, a biodegradabilidade da biomassa algal foi relativamente baixa, próxima a 30%, apresentando também um percentual de metano no biogás próximo de 63%. Em geral, as misturas proporcionaram aumentos nos valores destes parâmetros, chegando a valores próximos de 97% para biodegradabilidade e 71% para o percentual de metano.
- Todos os ensaios de co-digestão apresentaram índice de sinergia maior que um, indicando que a mistura dos substratos resulta em efeito sinérgico. O maior valor do índice de sinergia foi obtido quando se adicionou 50% de glicerina à biomassa algal, em termos de sólidos voláteis, proporcionando um aumento de cerca de 38 % no rendimento de metano com relação ao valor estimado.
- A avaliação de pH, alcalinidade, AGV, nitrogênio amoniacal, percentual de metano, DQO e sólidos, antes e após finalização dos testes, demonstrou que as misturas dos substratos apresentaram estabilidade e uma boa eficiência de conversão da matéria orgânica, o que é interessante visando a aplicação da co-digestão em escala contínua.
- Os melhores desempenhos de produção de metano foram relacionáveis com a razão C/N das misturas, sendo observado que relações C/N variando na faixa entre 20 e 30 foram as que proporcionaram os maiores índices de sinergia. Dessa forma, conclui-se sobre a importância deste parâmetro no rendimento final de metano em um processo de digestão anaeróbia.
- Através do planejamento centróide simplex, foi verificado que, nas condições avaliadas, o máximo rendimento de metano que pode ser obtido é de $719,6 \text{ NmL CH}_4.\text{gSV}_{\text{ad}}^{-1}$, através da digestão pura de glicerina. Em termos de potencial sinérgico, a adição de cerca de 30% de glicerina à biomassa algal é prevista como melhor proporção de mistura que leva a um

índice de sinergia máximo de 1,49, ou seja, um aumento de 49% no rendimento de metano, com relação à produção prevista.

6.2 Sugestões para pesquisas futuras

- Realizar novos testes de potencial bioquímico de metano, utilizando as proporções otimizadas previstas, visando validar o planejamento centróide simplex.
- Variar condições experimentais, tais como relação S/I, temperatura, agitação etc., utilizando as proporções otimizadas, para verificar o efeito destas variáveis no rendimento de metano e estabilidade dos reatores;
- Realizar testes em sistemas contínuos, proporcionando melhor adaptação da microbiota aos substratos e, por conseguinte, maiores acréscimos na produção específica de metano.
- Através de sistemas contínuos, executar frequente monitoramento das variáveis de estabilidade (pH, alcalinidade e ácidos voláteis) e desempenho do digestor (produção de metano, percentual de metano no biogás) permitindo melhor entendimento do processo de co-digestão.
- Verificar a viabilidade da utilização do metano produzido em escala piloto para geração de energia elétrica e/ou combustível veicular, através de um balanço entre a energia de entrada e de saída do sistema.

REFERÊNCIAS

- ABIOGAS. **Proposta de programa nacional do biogás e do biometano** (PNBB). São Paulo: Abiogás, 2018.
- AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. Ma.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011. DOI: 10.1016/J.RSER.2010.09.018.
- ALVES, I. R. F. .. **Avaliação da codigestão na produção de biogás**. 2016. UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro, [S. l.], 2016.
- ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. **Applied Microbiology and Biotechnology** **1993 38:4**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 560–564, 1993. DOI: 10.1007/BF00242955. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00242955>. Acesso em: 9 jul. 2022.
- ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, n. 59, v.5, 2009.
- ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Ministério de Minas e Energia (MME). Rio de Janeiro, 2021.
- ANP. **Resolução ANP No 685 DE 29/06/2017**. Estabelece as regras para aprovação do controle da qualidade e a especificação do biometano oriundo de aterros sanitários e de estações de tratamento de esgoto destinado ao uso veicular e às instalações residenciais, in. Disponível em: <<https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=345545>>.
- APHA, AWWA, and WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 25th ed. Baltimore: Port City Press, 2017.
- AQUINO, F. Aquino; CHERNICHARO, Carlos A. L.; FORESTI, Eugênio; FLORENCIO, Maria de Lourdes dos Santos; MONTEGGIA, Luiz. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 192–201, 2007.
- ASSEMANY, PAULA PEIXOTO. **Valorização energética de biomassa algal cultivada em águas residuárias via digestão anaeróbia**. 2017. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, [S. l.], 2017.
- BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BRASIL. Lei n.º 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário**

Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 14/01/2005, n. 10, s. 1, p. 8. 2005.

BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 mar. 2016.

BRASIL. **Lei nº 14.026**, de 15 de julho de 2020. Atualiza o marco legal do saneamento básico e dá outras providências. **Diário Oficial da União** 2020; 16 jul.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010. DOI: 10.1016/J.RSER.2009.10.009.

BROWN, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. **Nutritional properties of microalgae for mariculture.** **Aquaculture**, 151, pp 315-331. 1997.

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

CETESB. **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola.** 2015.

CHEN, Paris Honglay; OSWALD, William J. Thermochemical treatment for algal fermentation. **Environment International**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 889–897, 1998. DOI: 10.1016/S0160-4120(98)00080-4.

CHEN, Wan Ting; ZHANG, Yuanhui; ZHANG, Jixiang; YU, Guo; SCHIDEMAN, Lance C.; ZHANG, Peng; MINARICK, Mitchell. Hydrothermal liquefaction of mixed-culture algal biomass from wastewater treatment system into bio-crude oil. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 152, p. 130–139, 2014. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2013.10.111.

CHEN, Ye; CHENG, Jay J.; CREAMER, Kurt S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 2008. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2007.01.057.

CHERNICHARO, Carlos A. L. **Reatores anaeróbios.** 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016.

CIBIOGÁS. Nota Técnica: N° 002/2010. **Panorama do Biogás no Brasil em 2021.** Foz do Iguaçu, 2022.

COELHO, Suani Teixeira; GOLDEMBERG, José; LUCON, Oswaldo; GUARDABASSI, Patricia. Brazilian sugarcane ethanol: lessons learned. **Energy for Sustainable Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 26–39, 2006. DOI: 10.1016/S0973-0826(08)60529-3.

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

DJALMA NUNES FERRAZ JÚNIOR, Antônio; KOYAMA, Mirian H.; DE ARAÚJO JÚNIOR, Moacir M.; ZAIAT, Marcelo. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane

vinasse. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 89, p. 245–252, 2016. DOI: 10.1016/J.RENENE.2015.11.064.

DONOSO-BRAVO, Andres; ORTEGA, Valentina; LESTY, Yves; BOSSCHE, Hugues Vanden; OLIVARES, Diego. Addressing the synergy determination in anaerobic co-digestion and the inoculum activity impact on BMP test. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 80, n. 2, p. 387–396, 2019. DOI: 10.2166/WST.2019.292.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G.; BIRCH, E. J.; EATON-RYE, J. J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. **Applied Energy**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 3454–3463, 2011. DOI: 10.1016/J.APENERGY.2010.10.020.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M. J.; RINCÓN, B.; FERMOSO, F. G.; JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R. Assessment of two-phase olive mill solid waste and microalgae co-digestion to improve methane production and process kinetics. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 157, p. 263–269, 2014. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2014.01.096.

FLORENCIO, Lourdinha et al. Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 368–374, 1993.

FUESS, Lucas Tadeu; GARCIA, Marcelo Loureiro. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 145, p. 210–229, 2014. DOI: 10.1016/J.JENVMAN.2014.07.003.

GANESH SARATALE, Rijuta; KUMAR, Gopalakrishnan; BANU, Rajesh; XIA, Ao; PERIYASAMY, Sivagurunathan; DATTATRAYA SARATALE, Ganesh. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 262, p. 319–332, 2018. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2018.03.030.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic digestion of Algae. **Applied microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 47–55, 1957. DOI: 10.1128/AEM.5.1.47-55.1957.

GONZALEZ-FERNANDEZ, Cristina; SIALVE, Bruno; MOLINUEVO-SALCES, Beatriz. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 198, p. 896–906, 2015. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2015.09.095.

GONZÁLEZ, R.; SMITH, R.; BLANCO, D.; FIERRO, J.; GÓMEZ, X. Application of thermal analysis for evaluating the effect of glycerine addition on the digestion of swine manure. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 135, n. 4, p. 2277–2286, 2019. DOI: 10.1007/S10973-018-7464-8/TABLES/3.

HASSAN, Muhammad; DING, Weimin; SHI, Zhendan; ZHAO, Sanqin. Methane enhancement through co-digestion of chicken manure and thermo-oxidative cleaved wheat straw with waste activated sludge: A C/N optimization case. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 534–541, 2016. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2016.03.148.

KAYHANIAN, Masoud. Performance of a high-solids anaerobic digestion process under

various ammonia concentrations. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 349–352, 1994. DOI: 10.1002/JCTB.280590406. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.280590406>. Acesso em: 9 jul. 2022.

KIM, Jaai; KIM, Jinsu; LEE, Changsoo. Anaerobic co-digestion of food waste, human feces, and toilet paper: Methane potential and synergistic effect. **Fuel**, [S. l.], v. 248, p. 189–195, 2019. DOI: 10.1016/J.FUEL.2019.03.081.

KIM, Na Kyung; LEE, Sang Hoon; KIM, Yonghoon; PARK, Hee Deung. Current understanding and perspectives in anaerobic digestion based on genome-resolved metagenomic approaches. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 344, p. 126350, 2022. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126350.

KLASSEN, Viktor; BLIFERNEZ-KLASSEN, Olga; WOBBE, Lutz; SCHLÜTER, Andreas; KRUSE, Olaf; MUSSGUNG, Jan H. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 234, p. 7–26, 2016. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2016.07.015.

KOLESÁROVÁ, Nina; HUTAN, Miroslav; BODÍK, Igor; ŠPALKOVÁ, Viera. Utilization of biodiesel by-products for biogas production. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/126798.

KWIETNIEWSKA, Ewa; TYS, Jerzy. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 34, p. 491–500, 2014. DOI: 10.1016/J.RSER.2014.03.041.

LEITÃO, Carrhá Leitão et al. Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol oriundo de biodiesel. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, [S. l.], v. 180, p. 1–43, 2018. Disponível em: www.embrapa.br/agroindustria-tropical.

LI, Ruirui; DUAN, Na; ZHANG, Yuanhui; LIU, Zhidan; LI, Baoming; ZHANG, Dongming; DONG, Taili. Anaerobic co-digestion of chicken manure and microalgae *Chlorella* sp.: Methane potential, microbial diversity and synergistic impact evaluation. **Waste Management**, [S. l.], v. 68, p. 120–127, 2017. DOI: 10.1016/J.WASMAN.2017.06.028.

LIU, T.; SUNG, S. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 113–120, 2002. DOI: 10.2166/WST.2002.0304.

LONGARETTI, Gabriela; MEIRA, Joel Alexandre; SGANDERLA, Ivan Bovi; MAGRO, Jacir Dal; FIORI, Márcio Antônio; DE MELLO, Josiane Maria Muneron. Study of specific methanogenic activity of different anaerobic sludges. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 1139–1146, 2019. DOI: 10.1590/s1413-41522019140730.

LUNA-AVELAR, Karla D.; BARRENA, Raquel; FONT, Xavier; SÁNCHEZ, Antoni; SANTOS-BALLARDO, David U.; GERMÁN-BÁEZ, Lourdes J.; VALDEZ-ORTIZ, Angel. A preliminary assessment of anaerobic co-digestion potential of mango and microalgal residue biomass using a design of experiments approach: Effect of thermal, physical and biological pretreatments. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 128, p. 143–152,

2021. DOI: 10.1016/J.FBP.2021.04.015.

MCCARTY, Perry L. Anaerobic waste treatment fundamentals. **Public works**, [S. l.], v. 95, n. 9, p. 107–112, 1964.

MCCARTY, Perry L.; SMITH, Daniel P. Anaerobic wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 20, n. 12, p. 1200-1206, 1986.

MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 34, p. 167–173, 2014. DOI: 10.1016/J.RSER.2014.03.010.

MINOWA, Tomoaki; YOKOYAMA, Shin ya; KISHIMOTO, Michimasa; OKAKURA, Toru. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. **Fuel**, [S. l.], v. 74, n. 12, p. 1735–1738, 1995. DOI: 10.1016/0016-2361(95)80001-X.

MORAES, Bruna S.; ZAIAT, Marcelo; BONOMI, Antonio. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 44, p. 888–903, 2015. DOI: 10.1016/J.RSER.2015.01.023.

MUSSGNUM, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 51–56, 2010. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2010.07.030.

NASR, Noha; ELBESHBISHY, Elsayed; HAFEZ, Hisham; NAKHLA, George; HESHAM EL NAGGAR, M. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 111, p. 122–126, 2012. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.02.019.

NETO, Benício Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010.

NEUMANN, P.; TORRES, A.; FERMOSO, F. G.; BORJA, R.; JEISON, D. Anaerobic co-digestion of lipid-spent microalgae with waste activated sludge and glycerol in batch mode. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 100, p. 85–88, 2015. DOI: 10.1016/J.IBIOD.2015.01.020.

NOVI, J. C. et al. Análise da gestão do glicerol: Riscos e oportunidades sobre sua destinação frente à lacuna normativa e aspectos sustentáveis. **Revista Eletrônica de Administração**, v. 24, n. 3, p. 217–243, 2018.

NUNES FERRAZ JUNIOR, Antônio Djalma; ETCHEBEHERE, Claudia; PERECIN, Danilo; TEIXEIRA, Suani; WOODS, Jeremy. Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, p. 112045, 2022. DOI: 10.1016/J.RSER.2021.112045.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, [S. l.], v. 20, n. 4–6, p. 459–466, 2003. DOI: 10.1016/S1389-0344(03)00076-5.

OSWALD, William J.; GOLUEKE, Claence G. Biological Transformation of Solar Energy. **Advances in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. C, p. 223–262, 1960. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70127-8.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; FAKAS, Stylianos; FICK, Michel; CHEVALOT, Isabelle; GALIOTOU-PANAYOTOU, Maria; KOMAITIS, Michael; MARC, Ivan; AGGELIS, George. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 60–71, 2008. DOI: 10.1016/J.BIOMBIOE.2007.06.007.

PARK, Stephen; LI, Yebo. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 111, p. 42–48, 2012. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.01.160.

PASSOS, Fabiana; CORDEIRO, Paulo Henrique Miranda; BAETA, Bruno Eduardo Lobo; DE AQUINO, Sergio Francisco; PEREZ-ELVIRA, Sara Isabel. Anaerobic co-digestion of coffee husks and microalgal biomass after thermal hydrolysis. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 253, p. 49–54, 2018. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2017.12.071.

PASSOS, Fabiana; GARCÍA, Joan; FERRER, Ivet. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 138, p. 79–86, 2013. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2013.03.114.

PEIXOTO, Guilherme; PANTOJA-FILHO, Jorge Luis Rodrigues; AGNELLI, José Augusto Bolzan; BARBOZA, Marlei; ZAIAT, Marcelo. Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012. DOI: 10.1007/S12010-012-9807-4/TABLES/6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-012-9807-4>. Acesso em: 17 jul. 2022.

PRAJAPATI, Sanjeev Kumar; MALIK, Anushree; VIJAY, Virendra Kumar. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. **Applied Energy**, [S. l.], v. 114, p. 790–797, 2014. DOI: 10.1016/J.APENERGY.2013.08.021.

RAMOS-SUÁREZ, Juan L.; CARRERAS, Nely. Use of microalgae residues for biogas production. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 242, p. 86–95, 2014. DOI: 10.1016/J.CEJ.2013.12.053.

RAO, P. Venkateswara; BARAL, Saroj S. Experimental design of mixture for the anaerobic co-digestion of sewage sludge. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 172, n. 2–3, p. 977–986, 2011. DOI: 10.1016/J.CEJ.2011.07.010.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION *et al.* World fuel ethanol production. 2017. **RFA, Washington DC**, 2017.

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

ROCHA, Maria Aparecida Guilherme da. **Estudos da atividade metanogênica de lodos e da biodegradabilidade anaeróbia de efluentes de indústrias de bebidas**. 2003. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

RODRÍGUEZ-ABALDE, Ángela; FLOTATS, Xavier; FERNÁNDEZ, Belén. Optimization of the anaerobic co-digestion of pasteurized slaughterhouse waste, pig slurry and glycerine. **Waste Management**, [S. l.], v. 61, p. 521–528, 2017. DOI: 10.1016/J.WASMAN.2016.12.022.

SÁTIRO, Josivaldo Rodrigues. **Fatores que influenciam a biofloculação de microalgas em lagoas de alta taxa com esgotos sanitários**. 2021. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

SIALVE, Bruno; BERNET, Nicolas; BERNARD, Olivier. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 409–416, 2009. DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2009.03.001.

SILES LÓPEZ, José Ángel; MARTÍN SANTOS, María de los Ángeles; CHICA PÉREZ, Arturo Francisco; MARTÍN MARTÍN, Antonio. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 100, n. 23, p. 5609–5615, 2009. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2009.06.017.

SNIS. (2021). **Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento – 2020**. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-setor-saneamento>>.

SOLÉ-BUNDÓ, Maria; ESKICIOGLU, Cigdem; GARFÍ, Marianna; CARRÈRE, Hélène; FERRER, Ivet. Anaerobic co-digestion of microalgal biomass and wheat straw with and without thermo-alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 237, p. 89–98, 2017. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2017.03.151.

SOLÉ-BUNDÓ, Maria; PASSOS, Fabiana; ROMERO-GÜIZA, Maycoll S.; FERRER, Ivet; ASTALS, Sergi. Co-digestion strategies to enhance microalgae anaerobic digestion: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 112, p. 471–482, 2019. DOI: 10.1016/J.RSER.2019.05.036.

SOUZA, Francisca Adriana Fernandes De. **Adaptação de lodo sanitário e industrial ao tratamento do vinhoto**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande., 2011.

SURESH, Arumuganainar; SEO, Charles; CHANG, Ho Nam; KIM, Yeu Chun. Improved volatile fatty acid and biomethane production from lipid removed microalgal residue

(LRμAR) through pretreatment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 149, p. 590–594, 2013. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2013.09.123.

TAKEDA, Paula Yumi. **Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana-de-açúcar**. 2021. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade Federal de São Paulo, [S. l.], 2021.

VIANA, Michael Barbosa. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saneamento e Hidráulica) - Universidade de São Carlos, São Carlos – SP, [S. l.], 2011.

WANG, Meng; LEE, Eunyoung; ZHANG, Qiong; ERGAS, Sarina J. Anaerobic Co-digestion of Swine Manure and Microalgae *Chlorella* sp.: Experimental Studies and Energy Analysis. **Bioenergy Research**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1204–1215, 2016. DOI: 10.1007/S12155-016-9769-4/TABLES/7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-016-9769-4>. Acesso em: 20 jul. 2022.

WANG, Meng; SAHU, Ashish K.; RUSTEN, Bjørn; PARK, Chul. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 142, p. 585–590, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.096.

WANG, Wen; XIE, Li; CHEN, Jinrong; LUO, Gang; ZHOU, Qi. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3833–3839, 2011. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2010.12.012.

WANG, Q.; KUNINOBU, M.; OGAWA, H. I.; KATO, Y. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 16, p. 407–416, 1999.

WANG, Zhengxiang; ZHUGE, Jian; FANG, Huiying; PRIOR, Bernard A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 201–223, 2001. DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00060-X.

WARD, A. J.; LEWIS, D. M.; GREEN, F. B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. **Algal Research**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 204–214, 2014. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2014.02.001.

XAVIER, Marcus Renato. *The Brazilian Sugarcane Ethanol Experience*. [S. l.], 2007.

YADAV, Monika; JOSHI, Chandrakant; PARITOSH, Kunwar; THAKUR, Jyotika; PAREEK, Nidhi; MASAKAPALLI, Shyam Kumar; VIVEKANAND, Vivekanand. Organic waste conversion through anaerobic digestion: A critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. **Metabolic Engineering**, [S. l.], v. 69, p. 323–337, 2022. DOI: 10.1016/J.YMBEN.2021.11.014.

YAZDANI, Syed Shams; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007. DOI: 10.1016/J.COPBIO.2007.05.002.

YEN, Hong Wei; BRUNE, David E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 98, n. 1, p. 130–134, 2007. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2005.11.010.

ZHANG, Yanghanzi; CALDWELL, Gary S.; ZEALAND, Andrew M.; SALLIS, Paul J. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella vulgaris* and potato processing waste: Effect of mixing ratio, waste type and substrate to inoculum ratio. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 143, p. 91–100, 2019. DOI: 10.1016/J.BEJ.2018.12.021.

ZHEN, Guangyin; LU, Xueqin; KOBAYASHI, Takuro; KUMAR, Gopalakrishnan; XU, Kaiqin. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 299, p. 332–341, 2016. DOI: 10.1016/J.CEJ.2016.04.118.

ZHENG, Zehui; LIU, Jinhuan; YUAN, Xufeng; WANG, Xiaofen; ZHU, Wanbin; YANG, Fuyu; CUI, Zongjun. Effect of dairy manure to switchgrass co-digestion ratio on methane production and the bacterial community in batch anaerobic digestion. **Applied Energy**, [S. l.], v. 151, p. 249–257, 2015. DOI: 10.1016/J.APENERGY.2015.04.078.

APÊNDICE A – DADOS DE PRODUÇÃO ACUMULADA DE METANO

Tempo (dias)	Potencial bioquímico de metano acumulado (microalga:vinhaça:glicerina)																			
	100:0:0		0:100:0		0:0:100		50:50:0		50:0:50		0:50:50		33,3:33,3:33,3		66,7:16,7:16,7		16,7:66,7:16,7		16,7:16,7:66,7	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	11,21	1,73	49,64	0,00	19,17	7,00	45,95	3,53	42,26	29,04	63,33	12,20	77,64	3,13	45,50	14,23	63,52	0,00	35,09	24,81
2	17,44	5,33	112,41	0,15	115,58	3,75	85,90	0,00	98,05	0,68	117,69	5,30	130,38	3,66	81,43	5,30	120,40	0,75	63,31	20,69
3	24,92	6,44	151,10	3,37	145,04	1,68	116,58	0,30	138,74	5,71	160,05	7,10	169,49	6,30	117,50	14,33	169,27	2,17	101,61	9,52
4	35,92	1,12	184,78	5,24	170,60	0,12	145,55	0,07	189,34	2,54	227,26	1,20	249,84	0,74	197,57	14,93	237,60	2,10	140,16	11,13
5	43,06	3,68	213,84	3,68	191,16	2,23	169,72	0,30	316,89	8,66	287,63	3,50	356,56	2,36	235,86	6,06	308,11	1,28	238,97	12,40
6	47,64	2,33	240,27	0,60	238,11	14,22	189,02	0,98	420,56	19,72	414,37	6,60	406,07	2,41	255,23	4,77	346,78	1,13	403,13	17,37
7	54,02	3,53	269,78	0,38	303,43	38,89	210,27	0,08	452,09	1,20	517,54	7,10	433,75	2,60	269,48	0,71	376,46	0,15	471,69	11,75
8	61,37	0,30	296,92	2,10	440,92	42,28	225,49	0,67	478,35	1,67	552,02	8,30	466,69	2,05	286,87	5,33	409,90	0,30	504,54	9,00
9	70,06	0,75	324,65	1,95	559,17	16,45	242,06	0,07	503,26	4,78	584,56	4,46	483,73	4,95	297,81	4,96	434,26	0,37	526,29	10,25
10	74,41	0,30	341,52	1,42	571,03	7,06	248,95	0,60	520,06	0,29	598,95	2,82	496,11	8,96	301,12	2,52	454,11	2,41	555,79	23,70
12	80,58	0,75	366,19	0,45	588,77	14,13	258,81	1,73	538,63	4,73	615,80	1,46	501,57	4,15	303,83	1,24	461,47	1,20	570,63	11,02
13	87,11	0,08	379,40	0,15	601,91	4,73	266,54	0,08	549,06	0,83	617,60	2,39	520,34	4,46	314,49	4,96	474,69	0,90	579,64	3,47
14	91,46	0,15	385,79	1,28	615,73	3,75	270,52	0,08	560,85	3,68	623,61	1,65	530,00	2,82	317,34	1,81	480,24	1,20	585,19	2,46
15	96,65	0,23	394,50	0,60	629,54	2,10	276,08	0,30	567,46	0,30	627,21	3,02	542,43	1,46	321,70	2,05	489,63	0,68	591,00	2,10
16	102,28	0,23	402,23	0,83	645,31	2,40	282,08	0,30	575,95	0,83	632,02	1,96	550,99	2,39	331,74	4,74	506,65	0,22	595,45	0,93
17	107,22	0,60	406,73	1,20	651,38	5,92	286,80	0,37	580,75	1,65	632,02	2,83	553,61	1,65	331,74	0,00	507,70	0,30	597,35	1,16
18	111,20	0,22	409,13	0,45	662,03	1,05	290,25	0,60	584,49	1,50	633,66	0,99	558,32	3,02	334,44	1,27	515,58	0,23	598,95	0,34
19	114,58	0,23	411,53	0,45	669,38	1,05	293,33	0,68	585,17	0,68	635,77	1,05	564,04	1,96	337,75	1,56	521,81	0,08	602,10	2,28
20	118,41	0,08	414,46	0,38	677,73	0,21	296,49	0,45	585,62	0,45	639,07	2,01	567,34	2,83	342,85	2,25	530,22	0,75	603,93	1,42
21	122,54	0,08	417,76	0,00	687,06	1,19	300,39	1,05	586,07	0,45	642,38	0,67	571,57	0,99	342,85	0,21	530,90	0,68	607,86	1,74
22	127,04	0,15	421,29	0,53	696,52	1,20	306,32	0,08	589,68	3,60	647,33	0,66	576,14	1,05	342,85	0,00	534,20	0,30	611,17	0,46
23	130,12	0,08	423,02	0,23	703,80	0,83	310,45	0,53	592,46	0,08	649,00	0,57	578,84	2,01	342,85	0,14	534,73	0,53	613,60	1,84
24	133,73	0,30	427,45	0,23	716,50	1,44	313,84	0,38	596,51	2,55	649,30	0,45	586,18	0,78	344,36	0,71	535,78	1,05	617,45	0,39
25	137,93	0,45	431,28	0,83	721,23	2,33	319,17	0,08	601,92	0,30	651,85	0,38	590,84	0,67	346,02	0,75	539,83	0,00	622,11	2,85
26	141,69	0,45	435,19	0,00	724,66	1,18	322,77	0,30	604,17	1,80	652,00	0,00	594,73	0,66	346,02	0,00	549,44	6,46	624,83	1,75
27	145,74	0,45	437,44	1,20	728,69	0,58	325,70	0,68	606,72	2,10	654,25	0,53	604,28	0,57	348,58	1,20	555,75	2,25	629,25	2,63
28	149,65	0,15	440,82	0,53	732,12	1,18	329,90	0,45	609,05	1,88	655,31	0,23	604,28	0,00	350,52	0,92	562,57	0,37	630,67	0,70