

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
**MARIA CLARA DE OLIVEIRA**

MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E TERMOQUÍMICO DE BIOMASSA DE  
*SYNECHOCOCCUS SUBSALSUS* DENSIFICADA VISANDO À PRODUÇÃO DE  
BIOGÁS

**RIO DE JANEIRO**  
**2022**

Maria Clara de Oliveira

MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E TERMOQUÍMICO DE BIOMASSA DE  
*SYNECHOCOCCUS SUBSALSUS* DENSIFICADA VISANDO À PRODUÇÃO DE  
BIOGÁS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadoras: Magali Christe Cammarota, D.Sc.,  
Isabelli Dias Bassin, D.Sc.

Rio de Janeiro

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

048m Oliveira, Maria Clara de  
Métodos de pré-tratamento químico e termoquímico de biomassa de *Synechococcus subsalsus* densificada visando à produção de biogás / Maria Clara de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2022.  
168 f.

Orientadora: Magali Christe Cammarota.  
Coorientadora: Isabelli Dias Bassin.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2022.

1. Digestão Anaeróbia. 2. Pré-tratamento termoquímico. 3. Cianobactérias. I. Christe Cammarota, Magali, orient. II. Dias Bassin, Isabelli, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E TERMOQUÍMICO DE BIOMASSA DE  
*SYNECHOCOCCUS SUBSALSUS* DENSIFICADA VISANDO À PRODUÇÃO DE  
BIOGÁS

Maria Clara de Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS (EPQB), ESCOLA DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS.

Aprovada por:



---

Magali Christe Cammarota, D.Sc

---

Michelle Gonçalves Mothé, D.Sc.

---

Viridiana Santana Ferreira Leitão, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Novembro de 2022

Dedico este trabalho à minha mãe (*in memoriam*), pelo amor incondicional e todo seu apoio e esforço que me fizeram chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por toda a dedicação e pelo apoio incondicional de meus pais, Fátima e Severino, e minha tia Maria do Carmo.

À minha segunda família, Marisa, Dani e Facu, que mesmo de longe me acolhem e estão sempre presentes em minha vida.

À minha melhor amiga Kaolin, com quem sempre posso contar para compartilhar conquistas e frustrações.

Aos meus amigos de longa data, que me acompanham nesta jornada desde quando era apenas um sonho de uma criança que gostava muito de ciência, Fernanda, Naiara e Bruna (*in memoriam*).

Aos amigos da graduação, que me incentivaram em mais esta etapa, especialmente Gerson, Jéssica, Leonardo e Calu.

Aos meus amigos Ítalo, Mariléa, Giovanna, Bernardo e Felipe, que me proporcionaram momentos de respiro e alegria durante o mestrado, e também foram fontes de incentivo, atenção e paciência.

Ao Chaguinha e ao Anildo, que me ajudaram no deslocamento até a UFRJ em tempos de pandemia.

À Laura e ao Leandro, que me mostraram o caminho das pedras no laboratório, e a todos do Laboratório de Tecnologia Ambiental pelos momentos compartilhados. À Adriana, Victória, Edna e Tamires, do Laboratório de Microbiologia Industrial, pela ajuda na realização dos cultivos.

À bolsa de mestrado concedida através da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - PRH 17.1/ANP-FINEP, e aos pesquisadores-visitantes do PRH-17, que estiveram sempre à disposição. Aos demais colegas bolsistas, pelas trocas de experiências nos seminários internos.

Finalmente, às minhas orientadoras, a professora Magali e professora Isabelli, por todo o aprendizado, confiança, paciência e apoio durante o mestrado.

## RESUMO

Oliveira, Maria Clara de. **Métodos de pré-tratamento químico e termoquímico de biomassa de *Synechococcus subsalsus* densificada visando à produção de biogás.** Rio de Janeiro, 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A digestão anaeróbia da biomassa algácea é uma vantajosa rota de produção de biocombustíveis porque não requer a extração de componentes intracelulares específicos ou a secagem da biomassa. No entanto, os desafios desta rota incluem a baixa concentração de células no meio de cultivo e paredes celulares resistentes, fatores que podem dificultar a produção de metano. Para contornar estes problemas, pode-se adotar uma etapa de densificação da biomassa algácea, seguida por um método de pré-tratamento capaz de solubilizar a matéria orgânica. Assim, para concentrar a biomassa de *Synechococcus subsalsus*, adotou-se coagulação/floculação com quitosana, obtendo-se eficiências de floculação de  $89,9 \pm 6,7\%$ . Para auxiliar na escolha das condições de pré-tratamento da biomassa densificada, realizou-se uma análise comparativa dos resultados da literatura e um balanço energético. Os resultados desta análise sugeriram que o pré-tratamento termoquímico com ácido diluído em condições menos severas foi o mais eficiente, levando a um maior aumento na produção de metano. Além disso, os experimentos realizados mostraram que tanto a temperatura quanto a concentração de ácido influenciaram positivamente no aumento da solubilização da biomassa. Pré-tratamento termoquímico com ácido sulfúrico 0,2% v/v a 160°C e 2h, levou a um aumento de 276% na solubilização da biomassa densificada. A digestão anaeróbia da biomassa fresca resultou em um rendimento de  $269,7 \pm 29,0$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>in</sub>. No entanto, o rendimento da biomassa densificada e da biomassa densificada e pré-tratada foram menores, obtendo-se  $207,2 \pm 70$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>in</sub> e  $181,8 \pm 1,9$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>in</sub>, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos ao efeito da presença da quitosana, à maior quantidade de biomassa na digestão e aos compostos solubilizados pelo pré-tratamento. Não obstante, estes testes foram encerrados antes da completa estabilização da produção de metano, o que também prejudicou a avaliação do rendimento final. Além disso, observou-se um comportamento diáuxico na curva de produção específica, apontando para a necessidade de otimizar as condições de digestão anaeróbia.

Palavras-chave: Pré-tratamento termoquímico. Digestão anaeróbia. Cianobactérias.

## ABSTRACT

Oliveira, Maria Clara de. **Métodos de pré-tratamento químico e termoquímico de biomassa de *Synechococcus subsalsus* densificada visando à produção de biogás.** Rio de Janeiro, 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Anaerobic digestion of algal biomass is an advantageous biofuel production route because it does not require extraction of specific intracellular components or drying of the biomass. However, challenges of this route include low cell concentration in the culture medium and resistant cell walls, factors that can hinder methane production. To overcome these problems, a concentration step of the algal biomass can be adopted, followed by pretreatment to solubilize the organic matter. Thus, coagulation/flocculation of *Synechococcus subsalsus* with chitosan was adopted as a harvesting method, obtaining flocculation efficiencies of  $89.9 \pm 6.7\%$ . To aid in the choice of pretreatment conditions, a comparative analysis and energy balance of literature results was performed. The results of this analysis suggested that thermochemical pretreatment with dilute acid under less severe conditions was the most efficient, leading to a greater increase in methane production. Furthermore, the conducted experiments showed that both temperature and acid concentration positively influenced the increase on biomass solubilization. The thermochemical pretreatment with 0.2% v/v sulfuric acid at 160°C and 2h, led to a 276% increase in the solubilization of the biomass harvested with chitosan. Preliminary evaluation of the anaerobic digestion of fresh biomass resulted in a yield of  $269.7 \pm 29.0$  NmL CH<sub>4</sub>/g COD<sub>in</sub>. However, contrary to expectations, the yields of concentrated biomass and of concentrated and pretreated biomass were lower, obtaining  $207.2 \pm 70$  NmL CH<sub>4</sub>/g COD<sub>in</sub> and  $181.8 \pm 1.9$  NmL CH<sub>4</sub>/g COD<sub>in</sub>, respectively. Such results can be ascribed to the presence of chitosan, to the higher biomass concentration and to the molecules solubilized and formed during pretreatment. Nevertheless, anaerobic digestion tests for both concentrated biomass and of concentrated and pretreated biomass were stopped before the complete stabilization of methane production, which also compromised final yields. Moreover, a diauxic aspect was observed for the cumulative methane production, indicating the need of optimizing anaerobic digestion parameters.

Key-words: Thermochemical pretreatment. Anaerobic digestion. Cyanobacteria.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Representação das camadas que compõem a parede celular de cianobactérias. (a) parede Gram-negativa com presença de bainha mucilaginosa. (b) parede Gram-negativa com camada S acima da membrana externa e bainha de mucilagem.....	21
<b>Figura 2.2:</b> (a) Esquema de célula de cianobactéria e respectivas estruturas celulares. Representação fora de escala. (b) Micrografia eletrônica de uma célula de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. (c) e (d) zoom mostrando parede celular e tilacóides.....	22
<b>Figura 2.3:</b> (a) Reprodução por fissão binária em <i>Synechococcus aeruginosus</i> . (b) Microscopia eletrônica de varredura de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002. ....	23
<b>Figura 2.4:</b> Distribuição dos íons em torno das células no meio de cultivo. ....	25
<b>Figura 2.5:</b> Representação simplificada do processo de digestão anaeróbia. ....	31
<b>Figura 2.6:</b> Métodos mais comuns de pré-tratamento da biomassa.....	40
<b>Figura 2.7:</b> Rendimento em metano (mL CH <sub>4</sub> /g SV adicionados) versus aumento percentual na solubilização da matéria orgânica após o pré-tratamento químico e termoquímico da biomassa algácea – diversos autores. ....	59
<b>Figura 3.1:</b> Diagrama de blocos das etapas experimentais.....	63
<b>Figura 3.2:</b> Curva de produção de metano com aspecto de diauxia e estimativa gráfica dos parâmetros cinéticos. ....	77
<b>Figura 4.3:</b> Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano alcançados após pré-tratamento químico com álcalis em temperatura ambiente – vários autores	83
<b>Figura 4.4:</b> Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano após pré-tratamento químico com HCl em temperatura ambiente – Sposob et al. (2020).....	84
<b>Figura 4.5:</b> Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano alcançados após pré-tratamento termoquímico com NaOH – vários autores.....	84
<b>Figura 4.6:</b> Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano após pré-tratamento termoquímico com HCl – vários autores. ....	85
<b>Figura 4.7:</b> Efeito da concentração de reagente sobre o rendimento em metano no pré-tratamento químico com NaOH à temperatura ambiente (a) e no pré-tratamento termoquímico com HCl (b) – vários autores. ....	86
<b>Figura 4.8:</b> Efeito da concentração de reagente (a), temperatura (b) e tempo (c), no pré-tratamento termoquímico com NaOH, sobre o rendimento em metano – vários autores.....	88
<b>Figura 4.9:</b> Efeito da concentração de reagente (a), temperatura (b) e duração (c), do pré-tratamento termoquímico com HCl, sobre o rendimento em metano. ....	90
<b>Figura 4.11:</b> NER (net energy ratio) de diversos métodos de pré-tratamento da biomassa algácea visando aumento na produção de metano (Y <sub>p</sub> ).....	93
<b>Figura 4.12:</b> Aumento na solubilização da biomassa de cianobactérias após pré-tratamentos termoquímicos com HCl (Planejamento 1).....	99
<b>Figura 4.13:</b> Superfícies de resposta T (°C) versus [HCl] (% v/v) do Planejamento 1 para a variável dependente Sp. ....	102
<b>Figura 4.14:</b> Gráfico de Pareto mostrando os principais parâmetros que influenciam o aumento na solubilização da biomassa nos experimentos de pré-tratamento termoquímico do Planejamento 2.....	105
<b>Figura 4.15:</b> Superfícies de resposta T (°C) versus [HCl] (%v/v) do Planejamento 2 para a variável dependente Sp. (a) superfície 3D (b) superfície 2D; ° = limites do planejamento.....	106
<b>Figura 4.16:</b> Biomassa densificada de <i>S. subsalsus</i> após o pré-tratamento termoquímico ....	108
<b>Figura 4.17:</b> Rendimento em metano da digestão anaeróbia da biomassa algácea.....	110
<b>Figura 4.18:</b> Estimativa gráfica dos parâmetros cinéticos dos ensaios de digestão anaeróbia	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Eficiência de floculação química em diferentes espécies de microalgas .....	27
<b>Tabela 2.2:</b> Vantagens e desvantagens de métodos de separação da biomassa algácea .....	29
<b>Tabela 2.3:</b> Rendimento em metano obtidos na digestão anaeróbia mesofílica da biomassa algácea .....	36
<b>Tabela 2.4:</b> Composição química aproximada e componentes da parede celular de microalgas de relevância biotecnológica mais comuns .....	39
<b>Tabela 2.5:</b> Métodos de pré-tratamento físico, térmico e biológico de biomassa algácea para produção de metano .....	43
<b>Tabela 2.6:</b> Pré-tratamento químico e termoquímico de biomassa algácea para produção de metano. ....	50
<b>Tabela 3.1:</b> Composição do meio de cultivo BG-11. ....	68
<b>Tabela 3.2:</b> Níveis e valores reais das variáveis independentes testadas no Planejamento 1 ..	71
<b>Tabela 3.3:</b> Matriz de experimentos do Planejamento 1. ....	71
<b>Tabela 3.4:</b> Níveis e valores reais das variáveis independentes testadas no Planejamento 2 .	72
<b>Tabela 3.5:</b> Matriz de experimentos do Planejamento 2. ....	72
<b>Tabela 3.6:</b> Concentrações e volumes de biomassa e lodo nos ensaios de digestão anaeróbia.	74
<b>Tabela 4.7:</b> Caracterização da biomassa densificada .....	108
<b>Tabela 4.8:</b> Parâmetros cinéticos dos ensaios de digestão anaeróbia .....	113

## LISTA DE SIGLAS

IPCC – *Intergovernmental Panel on Climate Change* (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas)

AGV – ácidos graxos voláteis

DA – digestão anaeróbia

AOV – ácidos orgânicos voláteis

COV – carga orgânica volumétrica

PT – pré-tratamento

U – ultrassom

M – microondas

T – térmico

E – enzimático

COT – carbono orgânico total

DQO – demanda química de oxigênio

DQO<sub>S</sub> – DQO solúvel

DQO<sub>T</sub> – DQO total

DQO<sub>S0</sub> – DQO solúvel antes de pré-tratamento

DQO<sub>Sf</sub> – DQO solúvel após o pré-tratamento

DQO<sub>adic</sub> – DQO adicionada

ST – sólidos totais

SV – sólidos voláteis

SV<sub>S</sub> – sólidos voláteis solúveis

SV<sub>S0</sub> – sólidos voláteis solúveis antes do pré-tratamento

SV<sub>Sf</sub> – sólidos voláteis solúveis após o pré-tratamento

SSV – sólidos suspensos voláteis

SSV<sub>0</sub> – sólidos suspensos voláteis antes do pré-tratamento

SSV<sub>f</sub> – sólidos suspensos voláteis após o pré-tratamento

E/S – proporção enzima/substrato

TSAD – *two-stage anaerobic digestion* (digestão anaeróbia em dois estágios)

A – ácido

B – alcalino

T – temperatura

T<sub>amb</sub> – temperatura ambiente

nd – informação não disponível

AGCL – ácidos graxos de cadeia longa  
S<sub>0</sub> – matéria orgânica solúvel antes do pré-tratamento  
S<sub>f</sub> – solubilização após o pré-tratamento  
S<sub>p</sub> – aumento percentual na solubilização  
Y<sub>CH<sub>4</sub></sub> – rendimento em metano  
Y<sub>CH<sub>4</sub>-B</sub> – rendimento em metano sem pré-tratamento  
Y<sub>CH<sub>4</sub>-PT</sub> – rendimento em metano após o pré-tratamento  
Y<sub>p</sub> – aumento percentual no rendimento em metano  
CS – fator de severidade combinada  
BMA&K – banco de microalgas Adair & Kutner  
USP – Universidade do Estado de São Paulo  
D.O.750nm – densidade óptica medida a 750nm  
SST – sólidos suspensos totais  
TMR – tempo de mistura rápida  
TML – tempo de mistura lenta  
TS – tempo de sedimentação  
EF – eficiência de floculação  
FC – fator de concentração  
BMC – biomassa do cultivo  
BMD – biomassa densificada  
BMDA – biomassa densificada e submetida ao pré-tratamento termoquímico com ácido diluído  
I/S – razão inóculo/susbrato  
CNTP – condições normais de temperatura e pressão  
MGM – modelo de Gompertz modificado  
HMF – hidroximetilfurfural  
NER – *net energy ratio* (razão líquida de energia)  
na – não se aplica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
1.1	Introdução	14
1.2	Objetivos	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1.1	<i>Synechococcus subsalsus</i>	22
2.1.1	Cultivo e aplicações biotecnológicas das cianobactérias	23
2.1.2	Métodos de recuperação da biomassa algácea	24
2.2	Digestão Anaeróbia	30
2.2.1	Fundamentos da Digestão Anaeróbia	31
2.2.2	Digestão anaeróbia da biomassa algácea	34
2.3	Pré-tratamentos da Biomassa Algácea	39
2.3.1	Pré-tratamento mecânico	40
2.3.2	Pré-tratamento térmico	40
2.3.3	Pré-tratamento biológico	41
2.3.4	Pré-tratamento químico	47
2.3.5	Pré-tratamento termoquímico	48
2.3.6	Influência das condições de pré-tratamento químico e termoquímico sobre a solubilização da biomassa algácea	54
2.3.7	Influência do pré-tratamento químico e termoquímico na digestão anaeróbia	56
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>63</b>
3.1	Análise comparativa entre os métodos de pré-tratamento químico e termoquímico	64
3.2	Cultivo e caracterização da biomassa	67
3.3	Densificação da biomassa	69
3.4	Pré-tratamento termoquímico da biomassa de <i>Synechococcus subsalsus</i>	70
3.5	Digestão anaeróbia da biomassa de cianobactérias	74
3.6	Métodos analíticos	77
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>80</b>
4.1	Análise comparativa entre os métodos de pré-tratamento químico e termoquímico	80
4.1.1	Métodos de pré-tratamento selecionados	80
4.1.2	Relação entre solubilização da biomassa e rendimento em metano após pré-tratamento	83
4.1.3	Influência das condições de pré-tratamento químico e termoquímico sobre o rendimento em metano da biomassa algácea	86
4.1.4	Severidade do pré-tratamento termoquímico	91
4.1.5	Avaliação energética	93
4.2	Cultivo da biomassa de <i>S. subsalsus</i>	96
4.3	Densificação da biomassa de <i>S. subsalsus</i> por coagulação/floculação com quitosana	98
4.4	Pré-tratamento termoquímico com ácido da biomassa de <i>S. subsalsus</i>	98
4.4.1	Planejamento 1	98
4.4.2	Planejamento 2	102
4.4.3	Pré-tratamento termoquímico da biomassa densificada	107
4.5	Digestão anaeróbia da biomassa algácea	109
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	<b>116</b>
5.1	Conclusões	116
5.2	Sugestões	117
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>119</b>
	<b>APÊNDICE – Artigo publicado no periódico Fermentation</b>	<b>131</b>

# 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 Introdução

As mudanças climáticas causadas pelo aumento na emissão de gases de efeito estufa, em especial o CO<sub>2</sub>, têm impulsionado a busca por fontes de energia alternativas aos combustíveis fósseis (SINGH *et al.*, 2016). De acordo com o IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas), o aquecimento global precisa ser limitado a 1,5 °C até 2030, ou bem abaixo de 2 °C até 2050, para que os impactos sobre a vida na Terra sejam os menores possíveis (IPCC, 2019). Devido à dependência de combustíveis fósseis, o setor energético é um dos que mais contribui com o lançamento de CO<sub>2</sub> na atmosfera. O relatório *Global Carbon Budget* divulgou que, em 2018, 36,6 Gton de CO<sub>2</sub> foram emitidos em decorrência do uso de combustíveis fósseis (FRIEDLINGSTEIN *et al.*, 2019; PETERS *et al.*, 2020). Assim, uma transição para uma economia de baixo carbono deve ocorrer nos próximos anos, o que inclui aumentar a participação de fontes renováveis de energia na matriz energética mundial (JACKSON *et al.*, 2019).

Biocombustíveis obtidos a partir de oleaginosas e outras espécies vegetais destacaram-se tanto por serem renováveis quanto pela biomassa vegetal poder realizar fotossíntese, captando CO<sub>2</sub> da atmosfera no processo. Contudo, a necessidade de terras cultiváveis, fertilizantes e água de irrigação são algumas das desvantagens desta rota (COSTA *et al.*, 2019). Por outro lado, cresce o interesse pela produção de biocombustíveis de terceira geração, a partir da biomassa de microalgas e cianobactérias que neste trabalho será chamada de biomassa algácea, excluindo-se as macroalgas). Esta biomassa é bastante versátil, podendo-se obter biogás/biometano, biodiesel, bioetanol, biohidrogênio e biobutanol, dependendo da rota utilizada (CAVINATO *et al.*, 2017; WANG, Shuang *et al.*, 2022). Microalgas e algumas espécies de cianobactérias contribuem para a redução das emissões de CO<sub>2</sub> pois também são fotossintetizantes. Durante o seu crescimento, removem nutrientes de água residuárias, sendo possível realizar seu cultivo em efluentes ricos em matéria orgânica, sem a necessidade de água limpa ou fertilizantes (RUSTEN; SAHU, 2011; SALAMA *et al.*, 2017). Outras vantagens da biomassa algácea incluem requisitos nutricionais simples e alta produtividade, uma vez que em condições adequadas

crecem de 5 a 10 vezes mais rápido que biomassas terrestres (KRÖGER; MÜLLER-LANGER, 2012).

A produção de biogás por meio da digestão anaeróbia de biomassa algácea elimina vários obstáculos responsáveis pelos altos custos associados à geração de biocombustíveis de algas, incluindo secagem, extração e conversão ao combustível. Além disso, apresenta algumas vantagens sobre outras rotas de produção de biocombustíveis: possibilidade de uso de águas residuárias, viabilidade para reciclar nutrientes, utilização máxima da biomassa, produção mínima de lodo, custos operacionais mais baixos, menor consumo de energia e produção sustentável de biogás (DEPARTAMENTO DE ENERGIA, 2016). O primeiro estudo de digestão anaeróbia de microalgas, realizado por Golueke *et al.* (1957a) apresentou um rendimento de metano de 0,17–0,32 L CH<sub>4</sub>/g SV a partir das microalgas *Chorella vulgaris* e *Scenedesmus*. Experimentos de bancada e piloto, além de cálculos teóricos, têm demonstrado o grande potencial da digestão anaeróbia de microalgas para a produção de metano, apresentando um rendimento específico mais alto do que outras fontes de biomassa.

Mussnug *et al.* (2010) obtiveram rendimento de metano a partir de microalgas 7–13% superior quando comparado com silagem de milho. Ao estudar a digestão anaeróbia de duas espécies de microalgas, *Phaeodactylum tricornutum* e *Scenedesmus obliquus*, Zamalloa *et al.* (2012) obtiveram rendimento de metano de 0,36 e 0,24 L CH<sub>4</sub>/g SV, respectivamente. No entanto, alguns obstáculos técnicos e econômicos ainda são observados na digestão anaeróbia desse tipo de biomassa, particularmente em relação à baixa concentração celular nos cultivos e à recalcitrância da biomassa algácea bruta, fatores que ocasionam baixo rendimento de metano (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; ZABED *et al.*, 2020). Além disso, a composição química desta biomassa pode resultar em inibição da digestão anaeróbia devido ao acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV), oriundos da degradação dos lipídeos, ou de amônia livre, proveniente da degradação de proteínas.

Na prática, a baixa concentração celular nos cultivos significa que apenas uma pequena parte da matéria-prima é matéria orgânica disponível para ser convertida a metano, tornando necessário empregar algum processo para concentrar as células e remover a água do meio de cultivo. No entanto, as células da biomassa algácea não se agrupam naturalmente devido à repulsão eletrostática, uma vez que todas possuem carga superficial negativa (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2019; VANDAMME;

FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Além disso, os íons presentes no meio de cultivo se distribuem ao redor das células, formando uma suspensão estável. Por isso, estratégias de separação baseadas em sedimentação da biomassa resultam em baixa eficiência. Em contrapartida, processos baseados em centrifugação, filtração e separação por membranas têm, em geral, maior eficiência, porém, alto custo (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2019; MILLEDGE; HEAVEN, 2013). Segundo Sharma *et al.*, (2013), a etapa de separação pode representar 30% ou mais do custo total de produção da biomassa, tornando o processo economicamente inviável.

A coagulação/floculação é um método efetivo para a densificação de suspensões de microalgas e cianobactérias capaz de reduzir os custos desta etapa (BOHUTSKYI; BOUWER, 2012). Ao neutralizar as cargas do material em suspensão, os agentes coagulantes/floculantes auxiliam a formação de agregados com massa suficiente para sedimentar por gravidade. Sais como cloreto férrico, sulfato férrico e cloreto de alumínio são coagulantes tradicionais para a remoção de sólidos suspensos em efluentes nas estações de tratamento (MILLEDGE; HEAVEN, 2013). Nesse tipo de operação, o líquido é o produto desejado, que deve sair livre de contaminantes. No entanto, para utilizar a biomassa algácea como matéria-prima, é importante que os agentes químicos não interfiram nas etapas subsequentes do processamento da biomassa (WAN *et al.*, 2015). Dependendo da concentração utilizada na coagulação/floculação da biomassa algácea, os sais inorgânicos podem danificar as células e causar alterações nos pigmentos (PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010). Assim, agentes floculantes orgânicos de origem natural ou sintéticos têm sido investigados para densificação da biomassa de microalgas e cianobactérias (MUSTAFA; HAYDER; JAGABA, 2020). A coagulação/floculação utilizando quitosana tem sido reportada como método eficiente de concentração e sedimentação de microalgas e cianobactérias (MILLEDGE; HEAVEN, 2013; VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013; WAN *et al.*, 2015; ZHU; LI; HILTUNEN, 2018). A quitosana é um polímero natural catiônico e biodegradável (ZHU; LI; HILTUNEN, 2018) e, embora muitos trabalhos tenham investigado as condições ideais de pH e concentração de floculante, são poucos os que abordam a produção de metano da biomassa densificada com quitosana. Assim, seu efeito sobre a digestão anaeróbia ainda deve ser avaliado.

A fim de aumentar o rendimento em metano da digestão anaeróbia da biomassa algácea, diversos autores propõem métodos de pré-tratamento capazes de



solubilizar moléculas de difícil degradação que compõem a biomassa (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Estes métodos podem ser classificados em mecânico, térmico, químico e biológico, ou combinados entre si para potencializar o seu efeito. O pré-tratamento termoquímico, empregando reagentes ácidos ou alcalinos, é um método amplamente utilizado anterior à conversão energética de matérias-primas como biomassa lignocelulósica ou lodo ativado residual (AMIN *et al.*, 2017; KIM, Jeongsik *et al.*, 2003; LÓPEZ TORRES; ESPINOSA LLORENS, 2008). Diversos estudos tem buscado adaptar este método para a biomassa algácea, explorando diferentes condições de temperatura, concentração de reagente e duração (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; CANDIA-LOMELI *et al.*, 2022; DU *et al.*, 2020; MAHDY *et al.*, 2014a; MARQUES *et al.*, 2018; MARTÍN JUÁREZ *et al.*, 2018; PASSOS *et al.*, 2016; PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999; RINCÓN-PÉREZ *et al.*, 2019; SAMSON; LEDUY, 1983; SANTOS *et al.*, 2014; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017; SPOSOB *et al.*, 2020).

De um modo geral, o pré-tratamento termoquímico leva a um alto grau de solubilização da matéria orgânica. Por outro lado, suas desvantagens incluem o custo dos reagentes, alteração no pH do digestor, possível inibição ou mesmo toxicidade aos microrganismos metanogênicos devido ao acúmulo de íons ou de intermediários de degradação, e corrosão dos equipamentos (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Os álcalis aumentam a área superficial específica da biomassa ao causar inchaço (*swelling*) após as reações de saponificação (ATELGE *et al.*, 2020; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017) favorecendo o acesso aos microrganismos digestores (MAHDY *et al.*, 2014a) além de desnaturar e solubilizar as proteínas (D'HONDT *et al.*, 2017; MENDEZ *et al.*, 2013). Já o pré-tratamento com ácido é bastante empregado para biomassas lignocelulósicas devido à sua eficiência em despolimerizar celulose e hemicelulose, convertendo-os em açúcares de menor massa molecular (ARIUNBAATAR *et al.*, 2014).

Apesar de auxiliar na degradação da biomassa, disponibilizando mais matéria orgânica para os microrganismos digestores, não se observa uma correlação entre o aumento na solubilização da biomassa e o aumento no rendimento em metano decorrente do pré-tratamento. Sendo assim, mais estudos são necessários para identificar quais condições de pré-tratamento termoquímico de fato beneficiam a digestão anaeróbia da biomassa algácea, e não apenas a solubilização. Além disso, poucos trabalhos combinam uma estratégia de densificação seguida de pré-tratamento termoquímico. Portanto, é preciso verificar também o efeito desta

combinação sobre a digestão anaeróbia da biomassa algácea e o rendimento em metano.

## 1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a solubilização e digestão anaeróbia da biomassa da cianobactéria *Synechococcus subsalsus* concentrada por coagulação/floculação com quitosana

Objetivos específicos:

- Densificar a biomassa de cianobactéria *Synechococcus subsalsus* via coagulação/floculação com quitosana em condição (pH, concentração de quitosana) apontada em trabalho anterior;
- Realizar o pré-tratamento termoquímico com ácido para solubilização da biomassa densificada de *Synechococcus subsalsus*, empregando uma análise comparativa da literatura especializada como base para escolha das condições experimentais iniciais, e um planejamento experimental para obter a melhor condição;
- Comparar a digestão anaeróbia da biomassa densificada antes e após o pré-tratamento termoquímico na condição selecionada na etapa anterior.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cianobactérias

Cianobactérias são microrganismos procariotos unicelulares que surgiram na Terra há aproximadamente 2,5 bilhões de anos (REVIERS, 2006). Devido à sua presença em diversos ambientes, foram os responsáveis pela oxigenação da atmosfera terrestre ao liberar oxigênio molecular como produto da fotossíntese. Estes microrganismos são amplamente conhecidos por sua atividade fotossintetizante, empregando o carbono inorgânico (CO<sub>2</sub>) para produzir energia e sintetizar matéria orgânica. Contudo, neste filo há também espécies heterotróficas que fixam carbono de fonte orgânica, em geral açúcares simples como a sacarose, e são capazes de crescer na ausência de luz (MADIGAN *et al.*, 2016). Há ainda espécies de metabolismo facultativo, como *Oscillatoria limnetica*, capaz de alterar seu metabolismo para utilizar sulfeto como doador de elétrons quando H<sub>2</sub>S está disponível em altas concentrações (PADAN, 1979).

Uma vasta diversidade de cianobactérias pode ser encontrada em diferentes ambientes terrestres e aquáticos marinhos ou de água doce. Nos oceanos, cianobactérias unicelulares pertencentes aos gêneros *Synechococcus* e *Prochlorococcus* são os produtores primários majoritários (OREN, 2013). Por outro lado, as cianobactérias também são capazes de fixar nitrogênio, refletindo a sua importância ecológica (MADIGAN *et al.*, 2016). Cianobactérias habitam lugares inóspitos como desertos, fontes termais, lagos salinos e geleiras, mostrando-se adaptadas a condições extremas de temperatura, pressão, salinidade e pH (MADIGAN *et al.*, 2016).

O surgimento de florações de cianobactérias é considerado um indicador de desequilíbrio ambiental que causa, em última instância, a eutrofização dos corpos hídricos. Além disso, metabólitos secundários excretados pelas cianobactérias podem ser tóxicos aos demais seres vivos. Alguns destes metabólitos já foram identificados como substâncias neurotóxicas e hepatotóxicas para os seres humanos (BRASIL, 2016).

O tamanho das células das cianobactérias pode variar de 0,5 a 100 µm de diâmetro. Há espécies que se apresentam como células individuais e espécies filamentosas. As cianobactérias são encontradas como células de vida livre, na forma

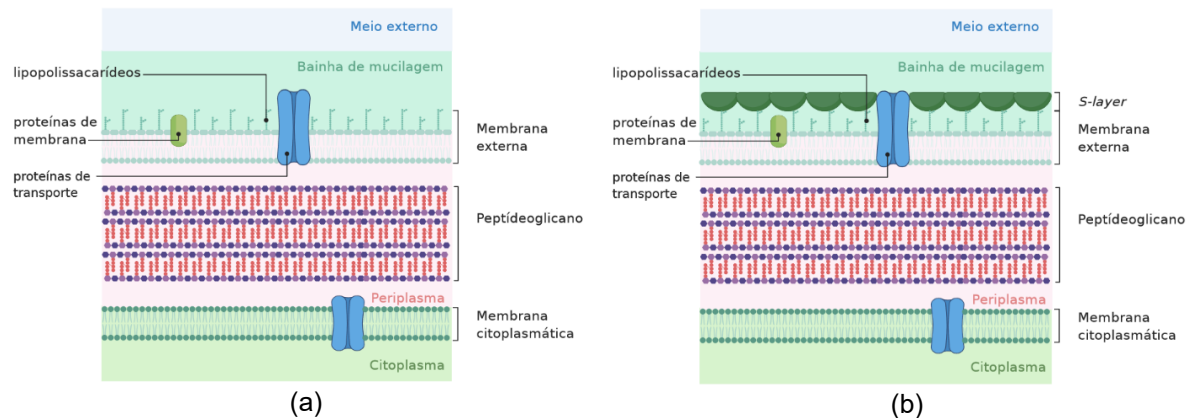
de colônias ou em simbiose com outros organismos, como plantas e fungos (MADIGAN *et al.*, 2016).

A parede celular das cianobactérias apresenta características semelhantes às de bactérias Gram-negativas. Nesses microrganismos, a camada mais interna é a membrana citoplasmática (também chamada membrana interna), formada pela bicamada fosfolipídica. Logo após, há a camada de peptídeoglicano que, por sua vez, é revestida pela membrana externa (também uma bicamada de fosfolipídeos), de modo que o peptídeoglicano não fica exposto ao meio externo (MADIGAN *et al.*, 2016). A espessura da camada de peptídeoglicano é variável em cada espécie. Glicoproteínas e lipopolissacarídeos estão ancorados na membrana externa, enquanto que estruturas de transporte de material e proteínas de membrana estão presentes em ambas as membranas interna e externa (STANIER; BAZIRE, 1977).

Algumas espécies apresentam, ainda, uma camada adicional chamada *external serrated layer*, ou *S-layer* (camada S, em tradução livre), ancorada nos lipopolissacarídeos da membrana externa. A camada S é um polímero cristalino formado por um único tipo de proteína ou glicoproteína, tendo sido encontrada em espécies da ordem *Chroococcales* e em espécies filamentosas de *Oscillatoriales* (DVOŘÁK *et al.*, 2017; ŠMARDÁ *et al.*, 2002). A resistência oferecida pela parede celular das cianobactérias confere vantagens evolutivas e ecológicas, entretanto, representa um obstáculo para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas a partir das mesmas.

Muitas espécies de cianobactérias secretam exopolissacarídeos, formando um revestimento conhecido como bainha de mucilagem, que atua como uma barreira de proteção contra dessecação. A mucilagem pode envolver um pequeno grupo de células ou mesmo extensas colônias, mantendo as células agrupadas e evitando o desprendimento dos filamentos. Além disso, pigmentos acessórios como carotenos, que protegem a célula da radiação ultravioleta, podem estar associados à bainha de mucilagem (CASTENHOLZ, 2015). A bainha de mucilagem também auxilia no deslocamento das células das espécies que se movem por deslocamento superficial (MADIGAN *et al.*, 2016). A Figura 2.1 mostra uma representação da parede celular das cianobactérias e suas camadas.

**Figura 2.1:** Representação das camadas que compõem a parede celular de cianobactérias. (a) parede Gram-negativa com presença de bainha mucilaginosa. (b) parede Gram-negativa com camada S acima da membrana externa e bainha de mucilagem.

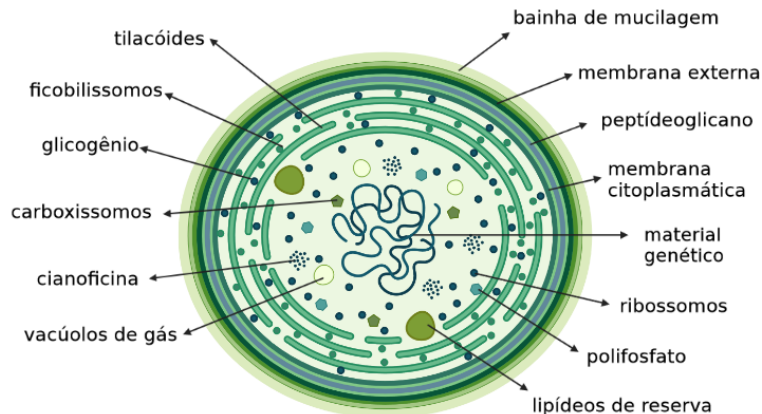


Fonte: Adaptado de Lima *et al.* (2020). Imagens criadas com o *software on-line* BioRender.com.

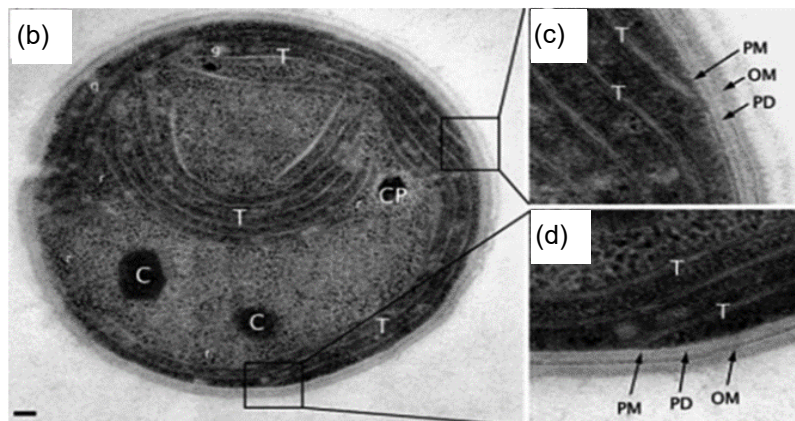
No interior das células (Figura 2.2) são encontrados grânulos de reserva de energia e nutrientes, essenciais para a sobrevivência em períodos de escassez de nutrientes e mudanças extremas em seus habitats. A reserva de carbono e energia mais comum é o glicogênio, produto da fotossíntese, mas amido também pode ser sintetizado com a mesma finalidade (MADIGAN *et al.*, 2016). Outros nutrientes armazenados pelas cianobactérias incluem nitrogênio, na forma de um polipeptídeo chamado cianoficina, e grânulos de polifosfato que funcionam como reserva de fósforo. Além disso, é possível encontrar no citoplasma das cianobactérias os ribossomos (onde ocorre a respiração endógena); carboxissomos, um reserva de enzima rubisco (necessária para a fixação de  $\text{CO}_2$  na fotossíntese); e, em algumas espécies aquáticas, são encontrados vacúolos gasosos cuja função é regular a posição das células na coluna d'água (MADIGAN *et al.*, 2006).

**Figura 2.2:** (a) Esquema de célula de cianobactéria e respectivas estruturas celulares. Representação fora de escala. (b) Micrografia eletrônica de uma célula de *Synechocystis* sp. PCC 6803. (c) e (d) zoom mostrando parede celular e tilacóides.

Legenda: r = ribossomos, g = glicogênio, C = carboxissomos, CP = cianoficina, T = tilacóides, PM = membrana citoplasmática, PD = peptídeoglicano, OM = membrana externa. Escala: 100 nm.



(a)



Fonte: (a) Elaboração própria, imagem criada com o *software on-line* BioRender.com.;

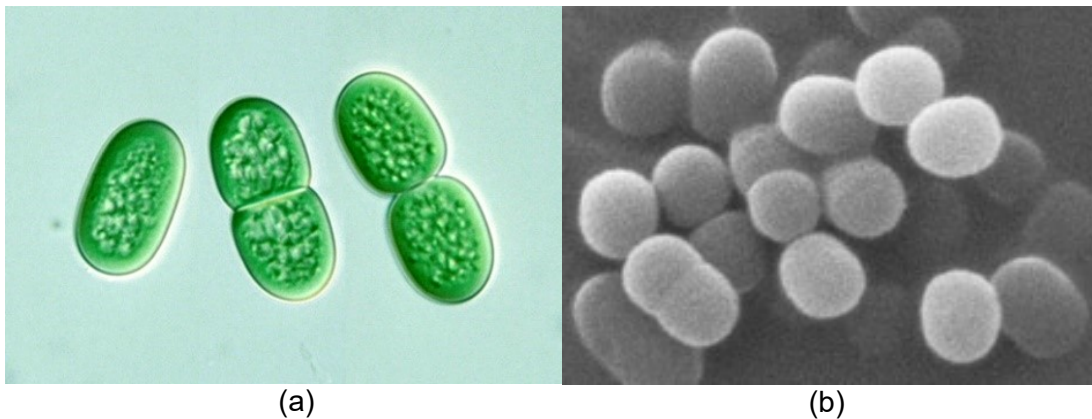
(b), (c) e (d): Adaptado de Liberton *et al.* (2006).

### 2.1.1 *Synechococcus subsalsus*

*Synechococcus subsalsus* é uma espécie marinha pertencente à classe das *Cyanophyceae*, à ordem *Synechococcales* e ao gênero *Synechococcus*. O gênero *Synechococcus* engloba cianobactérias com características morfológicas semelhantes à espécie *Synechococcus elongatus* descrita por Nägeli em 1849 (DVOŘÁK *et al.*, 2017). A Figura 2.3 mostra duas espécies de cianobactérias do gênero *Synechococcus*. De acordo com Komarék (2015), as cianobactérias deste gênero podem ter formato esférico, oval ou de bastão, retilíneo ou curvado; e seu diâmetro pode variar de 0,4 a 6,0  $\mu\text{m}$ . Em geral, são espécies de vida livre que se reproduzem por fissão binária e distribuem-se como células independentes após a

separação. Alternativamente, podem permanecer em duplas, formar pequenos grupos, colônias ou, ainda, pseudofilamentos. A bainha de mucilagem pode ou não estar presente nas células individuais (KOMÁREK; JOHANSEN, 2015). Espécies unicelulares de *Synechococcus* que formam parte do picoplâncton marinho (termo que designa uma comunidade de microrganismos, dentre eles microalgas e cianobactérias, que possuem diâmetro entre 0,2 e 2,0  $\mu\text{m}$ , e cuja principal forma de locomoção são as correntes marinhas) possuem motilidade natatória (MADIGAN *et al.*, 2016).

**Figura 2.3:** (a) Reprodução por fissão binária em *Synechococcus aeruginosus*. (b) Microscopia eletrônica de varredura de *Synechococcus* sp. PCC 7002.



Fonte: (a) Y. Tsukii, Protist Information Server (2005). (b) Liu *et al.* (2015).

Cianobactérias do gênero *Synechococcus* não são exclusivas de um ambiente específico, sendo encontradas no picoplâncton marinho, em água doce e em fontes termais. Apesar de morfologicamente semelhantes, há uma grande diversidade genética entre as espécies deste gênero, e suas relações evolutivas não estão completamente elucidadas (DVOŘÁK *et al.*, 2017).

### 2.1.1 Cultivo e aplicações biotecnológicas das cianobactérias

O sistema mais utilizado para a produção em larga escala de cianobactérias e microalgas são as lagoas abertas, devido ao baixo custo de construção e operação e baixa demanda energética. Neste tipo de sistema, as cianobactérias aproveitam diretamente a luz solar e o gás carbônico atmosférico (COSTA *et al.*, 2019). Tipicamente, as desvantagens das lagoas abertas são baixa produtividade de biomassa, resultando em menor concentração de células por volume de cultivo; pouco controle sobre as condições operacionais; influência das condições climáticas; e possível contaminação por fatores externos (YOUSUF, 2020). Por esses motivos, as

lagoas abertas são mais indicadas para o cultivo de espécies mais resistentes às variações ambientais, como temperatura e pH (COSTA *et al.*, 2019).

Outra forma de produção em massa de cianobactérias são os fotobiorreatores fechados. Nesses reatores, a iluminação é artificial e depende do fornecimento de energia elétrica. A maior vantagem dos fotobiorreatores é que, por otimizarem a incidência de luz e manterem o controle das condições operacionais, conseguem produzir cultivos mais concentrados que nas lagoas abertas. Eles ainda permitem melhor controle de temperatura, fornecimento de CO<sub>2</sub> e nutrientes; diminuem as chances de contaminação por microrganismos externos e não dependem de condições climáticas (YOUSUF, 2020). A principal desvantagem dos fotobiorreatores fechados está em seu alto custo de construção, pois requerem materiais mais sofisticados; e de operação, devido à alta demanda energética (YOUSUF, 2020).

Graças à sua grande versatilidade, as cianobactérias têm sido estudadas como plataforma biotecnológica para a produção de biocombustíveis e insumos de interesse para as indústrias química, farmacêutica, cosmética e de alimentos. Inúmeros estudos demonstraram o potencial bioativo de moléculas produzidas pelas cianobactérias. Carboidratos, lipídeos e proteínas encontram aplicações como produtos de alto valor tais como suplementos nutricionais, anti-inflamatórios e antioxidantes, dentre outros (ASLAM *et al.*, 2020; KOUTRA *et al.*, 2020). Por outro lado, carboidratos podem ser usados como substrato para produção de etanol, enquanto lipídeos são transformados em biodiesel via transesterificação (CHOO *et al.*, 2020; KOUTRA *et al.*, 2020). Além disso, as células (inteiras ou após a extração das moléculas de interesse) ainda podem ser usadas como matéria-prima na digestão anaeróbia para geração de metano ou na fermentação escura para geração de hidrogênio (CHOO *et al.*, 2020). Outra opção é incorporar a biomassa de cianobactérias como matéria-prima na fabricação de ração animal (ASLAM *et al.*, 2020).

### **2.1.2 Métodos de recuperação da biomassa algácea**

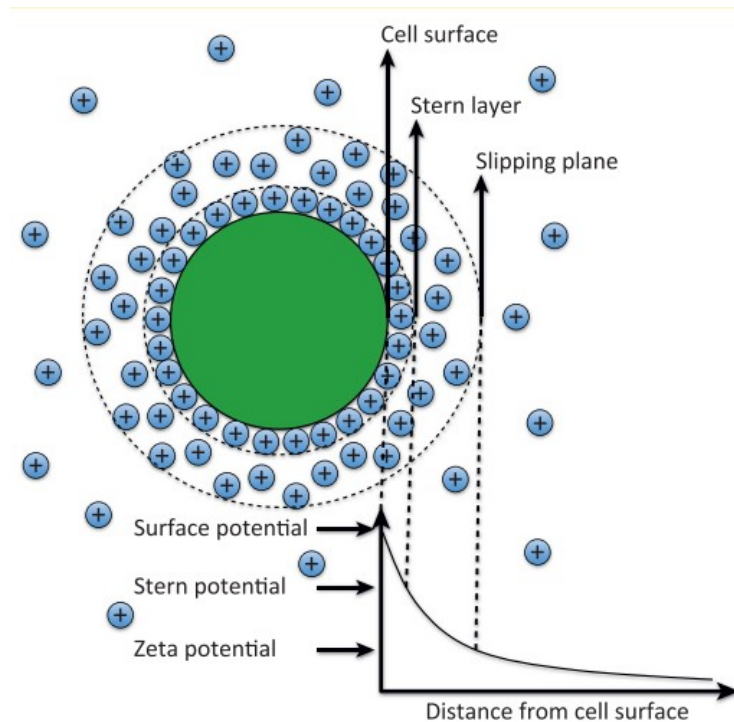
Um grande desafio para a ampla utilização da biomassa de cianobactérias e microalgas (neste trabalho denominada de biomassa algácea, embora não inclua macroalgas) para geração de produtos é o fato das células se encontrarem bastante diluídas no meio de cultivo. Em geral, a concentração de células no meio é baixa,



inferior a 1 g/L em lagoas abertas, e entre 2 e 6 g/L quando cultivadas em fotobiorreatores fechados (ROSELET *et al.*, 2019).

Além disso, efeitos eletrostáticos contribuem para que as células se mantenham suspensas no meio de cultivo. No exterior da célula estão presentes grupos funcionais que conferem uma carga superficial negativa às células, como os grupos carboxila e amina (ROSELET *et al.*, 2019). Por um lado, ocorre repulsão eletrostática entre as células, impedindo que elas se agreguem. Por outro, os íons em solução distribuem-se ao redor da célula de modo a neutralizar a carga superficial negativa, como ilustra a Figura 2.4. Desta maneira, forma-se uma suspensão estável da biomassa com o meio líquido, retardando ou mesmo impedindo a sua sedimentação natural (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013).

**Figura 2.4:** Distribuição dos íons em torno das células no meio de cultivo.



Fonte: Vandamme *et al.* (2013)

Consequentemente, mesmo nos sistemas de cultivo mais eficientes, a biomassa ainda precisa ser separada do meio líquido para posterior processamento, principalmente quando se trata de aplicações que envolvem a recuperação de produtos intracelulares.

Métodos comuns de separação sólido-líquido podem ser aplicados na recuperação da biomassa algácea, incluindo centrifugação, coagulação/floculação, flotação e filtração. O pequeno tamanho das células e o fato de as mesmas formarem

uma suspensão estável tornam a sedimentação por gravidade pouco eficiente para a separação da biomassa. A centrifugação, por usar forças superiores à da gravidade, apresenta elevadas eficiências de separação. Entretanto, devido ao elevado custo de operação, é utilizada apenas quando o produto final é de alto valor agregado. Para produtos de menor valor, como biocombustíveis, seu alto custo financeiro e demanda energética reduzem o custo-benefício (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

A coagulação/floculação é uma tecnologia conhecida e usada em diferentes indústrias com o objetivo de separar sólidos indesejados de um efluente líquido que, nesses casos, é o produto de interesse (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). A mesma técnica tem sido estudada para recuperar a biomassa de cianobactérias e microalgas. A floculação pode ser feita pela adição de um agente químico ou biológico que induz a formação de flocos. A floculação química ocorre devido à neutralização das cargas na superfície das células da biomassa. Sem a repulsão eletrostática, as células agrupam-se em flocos e sedimentam facilmente por gravidade.

Os floculantes químicos mais comuns são sais metálicos inorgânicos, como  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ . Polímeros catiônicos também têm sido estudados como floculantes orgânicos, podendo ser sintéticos ou naturais, como a quitosana. No caso dos polímeros, a longa cadeia polimérica também auxilia na floculação devido a um mecanismo chamado *bridging*, quando mais de uma célula fica aderida à mesma cadeia polimérica (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Uma vantagem do uso de polímeros naturais como floculantes é a sua biodegradabilidade, pois reduz-se o risco de contaminação nos processos *downstream* devido ao acúmulo do floculante na biomassa.

A autofloculação é um método no qual não há necessidade da adição de um agente floculante, embora o pH do meio precise ser ajustado para valor igual ou maior que 9,0. Nestas condições, ocorre a precipitação de compostos como fosfato de cálcio, hidróxido de magnésio e carbonato de cálcio. Ao precipitar, esses minerais arrastam consigo as células para o fundo do tanque (ROSELET *et al.*, 2019; VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). O ajuste do pH pode ser feito pela interrupção do fornecimento de  $\text{CO}_2$  ao cultivo ou através da adição de um álcali. Chen *et al.* (2013) obtiveram uma eficiência de coleta de 97% ao empregar autofloculação de *Scenedesmus* sp. em pH 11,5. Não obstante, ao empregar floculação química, com a adição de quitosana e cloreto férrico, eficiências similares foram obtidas, com

destaque para a baixa quantidade de quitosana necessária (CHEN *et al.*, 2013). Şirin *et al.* (2012) testaram a autofloculação da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum*, bem como a flocculação com sulfato de alumínio e quitosana. A eficiência de flocculação com quitosana superou os 90%, entretanto foi necessário ajustar o pH do meio para 9,9 para que a flocculação ocorresse (ŞIRIN *et al.*, 2012).

A bioflocculação consiste na adição de biopolímeros secretados por bactérias, como o ácido poli- $\gamma$ -glutâmico, ou mesmo de microrganismos capazes de induzir a flocculação da biomassa (ROSELET *et al.*, 2019). Algumas espécies de fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, formam agregados na forma de *pellets* que podem ser inseridos após formados ou produzidos em co-cultivo com as cianobactérias para recuperação da biomassa (OLIVEIRA; BASSIN; CAMMAROTA, 2019). Métodos de flocculação física também têm sido desenvolvidos utilizando ultrassom e eletrodos (eletrofloculação), mas ainda em escala de bancada (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013).

A Tabela 2.1 mostra resultados de eficiências obtidas com diferentes estratégias de flocculação. Zhu *et al.* (2018) utilizaram sulfato de alumínio e quitosana como agentes flocculantes para a recuperação da biomassa de *Chlorella vulgaris*. Os autores obtiveram eficiências comparáveis com ambos os flocculantes, superiores a 90%. No entanto, a concentração de quitosana foi dez vezes menor que a de sulfato de alumínio. A mesma concentração de quitosana também se mostrou eficiente na flocculação de *Chlorella* sp. por Yunos *et al.* (2017). Gutiérrez *et al.* (2015) estudaram a flocculação de uma biomassa mista de microalgas obtida de uma lagoa de alta taxa de tratamento de efluentes. Os flocculantes escolhidos foram os polímeros catiônicos naturais Ecotan e Tanfloc. A concentração ótima de agente flocculante foi 10 mg/L de Ecotan e 50 mg/L para Tanfloc, resultando em recuperação da biomassa acima de 90%.

**Tabela 2.1:** Eficiência de floculação química em diferentes espécies de microalgas

<b>Espécie</b>	<b>Concentração de flocculante (g/L) e pH</b>	<b>Eficiência de floculação (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	[Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ] = 2,5	92,4	Zhu <i>et al.</i> (2018)
	[Quitosana] = 0,25	91,9	
	[Quitosana] = 0,05	92,3	
<i>Chlorella sp.</i>	[Quitosana] = 0,05; pH neutro	80,3	Yunos <i>et al.</i> (2017)
Biomassa mista	[Ecotan] = 0,01; pH 7,7	91,8	Gutiérrez <i>et al.</i> (2015)
	[Tanfloc] = 0,05; pH 7,9	90,2	
<i>Scenedesmus sp.</i>	[FeCl <sub>3</sub> ] = 0,15	97,3	Chen <i>et al.</i> (2013)
	[Quitosana] = 0,08; pH 9	95	
	Auto-floculação, pH 11,5	97,4	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	[Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ] = 0,27 <sup>a</sup> ; pH 5,9	82,6	Şirin <i>et al.</i> , (2012)
	[Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ] = 0,18 <sup>a</sup> ; pH 9,9	91,8	
	Auto-floculação; pH 9,75	89	

<sup>a</sup> kg quitosana/ kg biomassa

Fonte: elaboração própria (2022)

A Tabela 2.2 apresenta uma comparação entre os métodos de separação sólido-líquido mais comuns aplicados na recuperação da biomassa algácea. A densificação da biomassa algácea é essencial para a produção de biocombustíveis e bioprodutos a partir desta biomassa. No entanto, dependendo do método utilizado, esta etapa corresponde a 30% ou mais dos custos de produção (SHARMA; STAL, 2013). Este problema afeta em especial os produtos de baixo valor agregado, como é o caso dos biocombustíveis, pois impede sua implementação em larga escala (MUSTAFA; HAYDER; JAGABA, 2020). A coagulação/floculação é um método de separação de baixa demanda energética e cujo custo está associado principalmente ao preço do flocculante. Além disso, a quitosana tem apresentado resultados promissores como agente flocculante, alcançando elevadas eficiências de recuperação da biomassa. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar as melhores condições de coagulação/floculação utilizado quitosana, desenvolvendo um método eficiente e com custo-benefício positivo.

**Tabela 2.2:** Vantagens e desvantagens de métodos de separação da biomassa algácea

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Referência</b>
Sedimentação	Baixo custo e baixo consumo de energia	Baixa velocidade de sedimentação das células; baixa recuperação; gera um concentrado com baixa concentração de sólidos	Roselet <i>et al.</i> (2019); Milledge e Heaven (2013)
Centrifugação	Alta eficiência; livre de agentes químicos ou biológicos; sem restrição de espécies	Alto custo econômico e demanda energética; risco de rompimento das células	Roselet <i>et al.</i> (2019);
Floculação química	Alta eficiência; permite o emprego de polímeros biodegradáveis	Restrição de aplicação dependendo do uso da biomassa, pois o agente floculante permanece aderido à biomassa; custo dos agentes floculantes; eficiência de floculantes poliméricos prejudicada pela salinidade	Roselet <i>et al.</i> (2019); Show <i>et al.</i> , (2019)
Autofloculação	Alta eficiência; pode ser feita sem o uso de reagentes químicos	Restrito a algumas espécies; alteração no pH da biomassa pode interferir no processamento posterior	Show <i>et al.</i> , (2019)
Biofloculação	Alta eficiência; agentes biodegradáveis	Restrição de aplicação dependendo do uso final da biomassa, visto que pode ocorrer contaminação biológica; pode requerer suplementação de substrato e nutrientes no co-cultivo	Roselet <i>et al.</i> (2019);
Floculação física	Alta eficiência; sem necessidade de adicionar agentes floculantes químicos ou biológicos	Difícil escalabilidade no caso da flotação induzida por ultrassom; necessidade de reposições sucessivas do eletrodo na eletrofloculação	Roselet <i>et al.</i> (2019); Wan <i>et al.</i> (2015)
Filtração	Alta eficiência	Entupimento do elemento filtrante, necessitando trocas sucessivas e elevando os custos de manutenção; membranas de menor diâmetro requerem maior pressão, aumentando o consumo energético	Roselet <i>et al.</i> (2019);
Flotação	Maior facilidade na remoção da biomassa; alta eficiência quando há adição de floculantes	Requer uma etapa anterior de adição de floculantes; eficiência está relacionada com o diâmetro das bolhas formadas (menor diâmetro, maior eficiência); flotação por ar dissolvido tem alta demanda energética, pois requer altas pressões	Roselet <i>et al.</i> (2019);
Eletroflotação	Alta eficiência; formação local de agentes floculantes devido à eletrólise; baixo consumo energético	Necessidade de trocas sucessivas do eletrodo metálico, ou de adição de um eletrólito quando se usa um eletrodo de carbono	Roselet <i>et al.</i> (2019);

Fonte: elaboração própria (2022)

## 2.2 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é um processo bioquímico complexo conduzido por uma população microbiana mista de bactérias e arqueias metanogênicas anaeróbias que atuam na degradação da matéria orgânica. Atualmente, é uma tecnologia consolidada voltada para o tratamento biológico de resíduos e efluentes, sendo aplicada a uma ampla gama de materiais orgânicos (KHANAL, 2009).

O processo de digestão anaeróbia não necessita de alta temperatura ou pressão, e suas vantagens incluem a capacidade de processar uma ampla gama de materiais orgânicos, sólidos e líquidos (concentrados ou diluídos); a possibilidade de reciclagem ou recuperação de nutrientes, uma vez que o subproduto (digestato) pode ser empregado como fertilizante no solo; e a possibilidade de recuperação de energia na forma de metano após a purificação do biogás. As desvantagens são a necessidade de mão de obra especializada para projeto, construção e operação do reator anaeróbio; controle dos parâmetros operacionais, como temperatura e pH; sensibilidade das arqueias metanogênicas a compostos químicos presentes na matéria-prima, dentre outros.

Em função da necessidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, a digestão anaeróbia tem ganhado destaque também como uma rota de produção de bioenergia, uma vez que o biogás gerado no processo tem potencial de ser usado como fonte de energia térmica e/ou elétrica. Para conversão energética, o material deve conter carboidratos, proteínas, gorduras, celulose e hemicelulose como componentes principais. Angelidaki e Sanders (2004) estimaram que o potencial de produção de metano a partir de lipídeos, proteínas e carboidratos é de 1.040 mL CH<sub>4</sub>/g SV, 496 mL CH<sub>4</sub>/g SV e 415 mL CH<sub>4</sub>/g SV, respectivamente. O biogás gerado no processo é um gás incolor e, dependendo da sua composição, inodoro. Tipicamente, 50 a 75% do biogás é composto por metano, 25 a 45% de gás carbônico, e quantidades menores de hidrogênio, nitrogênio, sulfeto de hidrogênio, oxigênio, amônia e monóxido de carbono. O componente energético do biogás é o metano, que pode ser extraído para ser aproveitado como combustível. Seu percentual no biogás varia de acordo com a composição química do material digerido, os parâmetros operacionais do processo e a ocorrência ou não de desequilíbrios no reator anaeróbio.

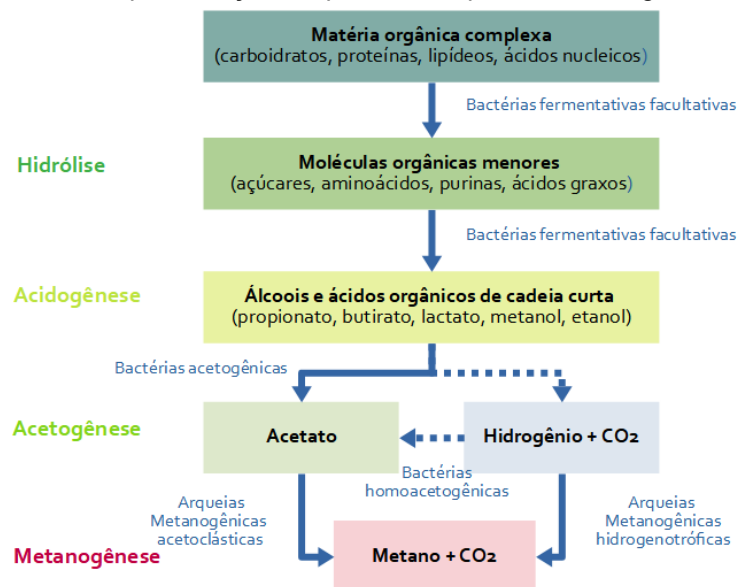
## 2.2.1 Fundamentos da Digestão Anaeróbia

De acordo com Chernicharo (2019),

“A digestão anaeróbia pode ser considerada como um ecossistema onde diversos grupos de microrganismos trabalham interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de novas células bacterianas”.

Tradicionalmente, divide-se as etapas da biodigestão de acordo com a transformação da matéria orgânica, cada qual conduzida por grupos específicos de microrganismos, como se observa na Figura 2.5. Bactérias fermentativas dominam as primeiras etapas, enquanto arqueias metanogênicas são as responsáveis pela geração de metano na etapa final (KHANAL, 2009).

**Figura 2.5:** Representação simplificada do processo de digestão anaeróbia.



Fonte: elaboração própria (2021).

Na primeira etapa, a hidrólise, compostos orgânicos complexos, como proteínas, carboidratos e lipídeos, são transformados em moléculas de menor massa molecular pela ação de enzimas hidrolíticas extracelulares secretadas por bactérias fermentativas. Para materiais de composição complexa, a hidrólise pode se tornar a etapa limitante da digestão anaeróbia, afetando o rendimento em metano devido à baixa disponibilidade de matéria orgânica solubilizada. Em seguida, na acidogênese, bactérias fermentativas usam os produtos hidrolisados como fonte de carbono dando origem a hidrogênio, gás carbônico, álcoois e ácidos orgânicos de cadeia curta, também chamados ácidos orgânicos voláteis (AOV). A acetogênese é a etapa seguinte, na qual bactérias acetogênicas são responsáveis por converter os ácidos

orgânicos voláteis a acetato, produzindo também hidrogênio e gás carbônico (CHERNICHARO, 2019; KHANAL, 2009).

Concomitantemente, ocorre a homoacetogênese, etapa na qual as bactérias anaeróbias empregam o hidrogênio como doador de elétrons para produzir acetato. Bactérias anaeróbias autotróficas utilizam o gás carbônico gerado em outras etapas da digestão anaeróbia como fonte de carbono, enquanto espécies heterotróficas empregam como fonte de carbono os álcoois de cadeia curta, como metanol. As reações de oxidação dos ácidos orgânicos a acetato necessitam de baixa concentração dos produtos para ocorrerem. As bactérias homoacetogênicas e as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas consomem o hidrogênio ao mesmo tempo em que este é produzido, mantendo a pressão parcial de  $H_2$  em níveis mínimos, o que favorece a acetogênese (CHERNICHARO, 2019; KHANAL, 2009).

Por fim, na metanogênese, dois grupos de arqueias metanogênicas estão envolvidas na conversão da matéria orgânica a metano: as acetotróficas e as hidrogenotróficas. O primeiro grupo consome o acetato para produzir metano ( $CH_4$ ). Cerca de dois terços de todo o metano gerado na digestão anaeróbia se dão pela via acetotrófica, conduzida por arqueias dos gêneros *Metanosarcina* e *Metanosaeta*, dentre outras. Arqueias hidrogenotróficas produzem o restante um terço do metano, consumindo  $CO_2$  como fonte de carbono e  $H_2$  como doador de elétrons (KHANAL, 2009).

Além dos microrganismos envolvidos nas etapas da digestão anaeróbia, em um reator anaeróbio pode ocorrer ainda a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) quando da presença de compostos de enxofre. Tais bactérias são estritamente anaeróbias e reduzem sulfato, sulfito e outros compostos de enxofre a sulfeto de hidrogênio. Ademais de empregarem os compostos de enxofre como doadores de elétrons, as BRS competem por hidrogênio e substrato com as demais bactérias e arqueias, uma vez que metabolizam moléculas orgânicas como fonte de carbono e energia. A atividade das BRS pode ser problemática no caso de efluentes com alta concentração de sulfatos, visto que o  $H_2S$  compromete a qualidade do biogás, além de provocar problemas de corrosão e toxicidade no reator (CHERNICHARO, 2019).

A relação entre os microrganismos anaeróbios é muito delicada e qualquer perturbação pode comprometer este equilíbrio, favorecendo um grupo em detrimento de outros. O metabolismo das arqueias metanogênicas, em especial, é bastante sensível às condições ambientais, como temperatura e pH, por isso é importante que



as condições em que ocorre a digestão anaeróbia sejam adequadas para a atividades dos microrganismos anaeróbios.

Usualmente adotam-se temperaturas mesofílicas entre 30 e 35°C na digestão anaeróbia, mas também é possível operar o processo na faixa termofílica entre 45 e 70 °C (CHERNICHARO, 2019). Na digestão anaeróbia, é ideal manter o pH próximo ao neutro, geralmente entre 6,8 e 7,2, para não causar perturbações na atividade das arqueias metanogênicas. Essa faixa compreende o melhor pH para as arqueias, cujo crescimento ótimo se dá entre 6,6 e 7,4, e também para a atividade das bactérias acidogênicas, para as quais o pH ideal se encontra entre 5,0 e 6,0. Em pHs inferiores a este limite, a produtividade de metano diminui consideravelmente, e em pH alcalino, a metanogênese é comprometida pelo acúmulo de amônia livre, que causa inibição às arqueias (CHERNICHARO, 2019).

Apesar de comporem parte essencial de nutrientes (nitrogênio, fósforo e enxofre) e micronutrientes necessários ao crescimento microbiano, sais minerais e cátions metálicos (Fe, Co, Ni, Mo, Se) se tornam prejudiciais à digestão anaeróbia a partir de determinadas faixas de concentração (CHERNICHARO, 2019). Cátions de cobre, cromo, níquel, zinco, arsênio e o íon cianeto são considerados altamente tóxicos quando em excesso (CHERNICHARO, 2019).

A amônia também pode ser tóxica aos organismos anaeróbios e sua formação é consequência da degradação das proteínas e compostos nitrogenados da matéria-prima. Alterações no pH afetam o equilíbrio entre a amônia livre e o íon amônio, favorecendo a prevalência de uma ou outra espécie. Em pH na faixa do neutro, a espécie iônica é a dominante, já em pH mais alto, amônia passa a se acumular na forma livre (NH<sub>3</sub>) (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

Ácidos orgânicos, apesar de não serem tóxicos por si só, em alta concentração podem levar a uma inibição indireta dos microrganismos metanogênicos por alterarem o pH do meio. O acúmulo concomitante de ácidos orgânicos voláteis e amônia livre por vezes produzem um “estado estacionário inibido”, no qual a produção de metano não cessa, mas é reduzida devido à acidificação do reator (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008). Mais considerações sobre inibição e toxicidade serão feitas na seção de pré-tratamentos da biomassa algácea.

### 2.2.2 Digestão anaeróbia da biomassa algácea

Originalmente, a digestão anaeróbia da biomassa de microalgas e cianobactérias foi proposta por Golueke e colaboradores, em 1957, como solução para o acúmulo desta biomassa nas lagoas de estabilização de efluentes. Nestas lagoas, microalgas e cianobactérias desempenham um importante papel na remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo. Enquanto consomem os nutrientes, estes microrganismos se multiplicam devido a alta disponibilidade de matéria orgânica. Uma vez alcançados os requisitos regulatórios, o efluente tratado pode ser despejado no ambiente. No entanto, para evitar desequilíbrios ambientais, a biomassa acumulada precisa de uma destinação adequada. A digestão anaeróbia é, portanto, uma forma de aproveitar a biomassa algácea convertendo-a em energia na forma de metano (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957b).

No experimento pioneiro de Gouleke, os autores investigaram a digestão anaeróbia de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*, comparando sua eficiência com a da digestão anaeróbia do lodo ativado. Com este estudo, comprovou-se que é possível produzir biogás utilizando como matéria-prima a biomassa algácea, obtendo-se rendimentos de 170 a 320 mL CH<sub>4</sub>/g SV, e um biogás contendo 60% de metano. A análise microscópica do digestato revelou a presença de células verdes ainda intactas da biomassa algácea, apontando para a complexidade desta biomassa e a necessidade de aperfeiçoamento do processo a fim de alcançar melhor produtividade.

Os autores também compararam a digestão em condições mesofílica e termofílica, e a digestão da biomassa concentrada por centrifugação e floculação química. A digestão termofílica foi proposta como forma de auxiliar a degradação da biomassa algácea devido ao efeito da temperatura do reator porém, ao final do experimento ainda foram encontradas células de microalgas intactas no digestato (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957b).

Desde então, diversos autores têm se dedicado a estudar a digestão anaeróbia de microalgas e cianobactérias a fim de identificar os fatores que influenciam o processo. Muitos trabalhos exploram o potencial de metano de diferentes espécies de microalgas e cianobactérias comumente encontradas em lagoas de estabilização, bem como de espécies marinhas e de água doce (FRIGON *et al.*, 2013). No entanto, a separação da biomassa algácea do meio líquido e sua degradabilidade ainda

permanecem como os maiores desafios tecno-econômicos para viabilizar sua digestão anaeróbia em larga escala.

A Tabela 2.3 mostra resultados de rendimento em metano da digestão anaeróbia mesofílica de diversas espécies de microalgas e cianobactérias. Verifica-se que os rendimentos de metano variam consideravelmente de espécie para espécie, sendo afetados pela composição química da biomassa e rigidez da parede celular. Algumas espécies não têm parede celular e apresentam altos rendimentos como, por exemplo, *Dunaliella salina*. Outras, como *Chlamydomonas reinhardtii*, apresentam parede celular composta majoritariamente por glicoproteínas, sendo facilmente degradável e permitindo bons rendimentos em metano (MAHDY *et al.*, 2014b).

A maioria das espécies possui parede celular robusta, composta por camadas de celulose, hemicelulose, pectina, peptídeoglicano, e algina, dentre outros polímeros resistentes (D'HONDT *et al.*, 2017; DE CARVALHO *et al.*, 2020). Tais polímeros são responsáveis por conferir rigidez às células, dificultando sua degradação pelos microrganismos anaeróbios e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento em metano. Apesar da importância da caracterização da parede celular das microalgas, faltam informações na literatura sobre a composição química exata e estrutura da maioria das espécies. A discussão sobre pré-tratamentos da biomassa algácea voltados para melhorar sua degradabilidade e a produção de metano será abordada na seção 2.3.

Há um consenso de que concentrar a biomassa antes do pré-tratamento é crucial para um bom desempenho do reator anaeróbio. Em geral, a concentração de células no cultivo é muito baixa (ROSELET *et al.*, 2019), disponibilizando pouca matéria orgânica para a digestão. Além disso, dependendo das condições operacionais do reator, um elevado volume de líquido pode contribuir para o *washout* de células (WARD; LEWIS; GREEN, 2014). A maioria dos experimentos em escala de bancada reportados na literatura científica utiliza centrifugação para separar a biomassa do meio de cultivo e concentrá-la. Em escala piloto e em larga escala, no entanto, métodos mais econômicos e menos intensivos em energia se fazem necessários (ROSELET *et al.*, 2019).

**Tabela 2.3:** Rendimento em metano obtidos na digestão anaeróbia mesofílica da biomassa algácea

<b>Espécie</b>	<b>Digestão anaeróbia</b>	<b>Rendimento (mL CH<sub>4</sub>/g SV)</b>	<b>Referências</b>
Biomassa mista de <i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	Reator batelada 35°C, 105 dias	260	Solé-Bundó <i>et al.</i> (2017)
Biomassa mista de <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada 35 °C, 46 dias	117	Passos <i>et al.</i> (2014)
Biomassa mista de <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Monoraphidium</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., e <i>Amphora</i> sp.	Reator contínuo 37 °C, 20 dias COV 1.05 kg DQO/m <sup>3</sup> .d	180	Passos e Ferrer (2014)
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Chlorella kessleri</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Euglena gracilis</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>	Reator batelada, 38 °C, 32 dias	293 218 387 323 325 178	Mussgnug <i>et al.</i> (2010)
<i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Isochrysis</i> sp. <i>Scenedesmus dimorphus</i>	Reator batelada, 35 °C, 34 - 50 dias	343 – 370 333 408 397	Frigon <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 35 °C, 22 dias	263 191	Mahdy <i>et al.</i> (2014b)
<i>Chlorella</i>	Reator batelada, 37 °C, 45 dias	123	Wang <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella minutissima</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 36 °C, 30 dias	166 265 196	Prajapati <i>et al.</i> (2014)

<b>Espécie</b>	<b>Digestão anaeróbia</b>	<b>Rendimento (mL CH<sub>4</sub>/g SV)</b>	<b>Referências</b>
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Reator batelada, 30 °C, 42 dias	220 - 280	Ayala-Parra <i>et al.</i> (2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 35 °C, 28 dias	240	Ras <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 35°C, 35 dias	237	Markou <i>et al.</i> (2022)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada	337	Zhao <i>et al.</i> (2014)
<i>Microcystis spp</i>	35 °C, 30 dias	140	
<i>Nannochloropsis salina</i>		557	
<i>Nannochloropsis sp.</i>		357	
<i>Nanofrustulum sp.</i>		507	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		337	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 35 °C, 29 dias	156	Mendez <i>et al.</i> (2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 35 °C, 25 dias	229	Park <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Reator batelada, 35 °C, 30 dias	139 <sup>a</sup>	Mendez <i>et al.</i> (2013)
<i>Hydrodictyon reticulatum</i> (alga filamentosa)	Reator bateladas 35 °C, 25 dias	170	Lee <i>et al.</i> (2014)
<i>Microcystis spp.</i>	Reator batelada, 35 °C, 30 dias	140	Zeng <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Reator batelada, 35 °C, 19 dias	430	Quinn <i>et al.</i> (2014)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Reator batelada	270	Zamalloa <i>et al.</i> (2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	33 °C, 30 dias	130	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Reator batelada	76 <sup>a</sup>	González-Fernández <i>et al.</i> (2012)
<i>Scenedesmus sp.</i>	35 °C, 33-34 dias	82 <sup>a</sup>	

<b>Espécie</b>	<b>Digestão anaeróbia</b>	<b>Rendimento (mL CH<sub>4</sub>/g SV)</b>	<b>Referências</b>
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	Reator batelada, 37°C, 15 dias, pH 9 (inóculo adaptado)	155	Candia-Lomeli <i>et al.</i> (2022)
<i>Scenedesmus</i> sp. e <i>Chlorella</i> spp.	Reator batelada, 35 °C, 10 dias	100-140	Yen e Brune (2007)
<i>Pseudanabaena</i> sp.	Reator batelada, 35°C, 29 dias	251	Cuellar-Bermudez <i>et al.</i> (2019)
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	Reator batelada, 35°C, 30 dias	218,2	Mendez <i>et al.</i> (2016)
<i>Anabaena planctonica</i>		261,6	
<i>Chlorella vulgaris</i>		184,8	

<sup>a</sup> mL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic.</sub>

DQO = demanda química de oxigênio. COV = carga orgânica volumétrica. SV = sólidos voláteis.

Fonte: elaboração própria (2022)

### 2.3 Pré-tratamentos da Biomassa Algácea

A rigidez da parede celular da biomassa algácea é um dos principais desafios para a produção de metano a partir desta biomassa, uma vez que moléculas complexas são mais difíceis de serem degradadas pelos microrganismos hidrolíticos, tornando a hidrólise a etapa limitante da digestão (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). A Tabela 2.4 apresenta a composição macromolecular típica de algumas espécies de microalgas mais comuns, bem como a estrutura de sua parede celular.

**Tabela 2.4:** Composição química aproximada e componentes da parede celular de microalgas de relevância biotecnológica mais comuns

Espécie	Composição química das células <sup>a</sup>			Tipo de parede celular <sup>b</sup>
	Carboidratos	Proteínas	Lipídeos	
<i>Spirulina</i>	16%	71%	7%	Bainha de polissacarídeos; bicamada lipídica; camada de peptídeoglicano envolta por uma camada fibrilar composta por polissacarídeos como celulose e hemicelulose; membrana celular
<i>Scenedesmus</i>	17%	56%	14%	Camada de peptídeoglicano; camada de algina; camada fibrilar composta por polissacarídeos como celulose e hemicelulose; membrana celular
<i>Nannochloropsis</i>	32%	27%	15%	Camada de algina; camada de celulose; uma estrutura de suporte entre a camada celulósica e a membrana celular; membrana celular
<i>Chlorella</i>	17%	58%	22%	Camada de algina; camada fibrilar composta por polissacarídeos como celulose e hemicelulose; membrana celular

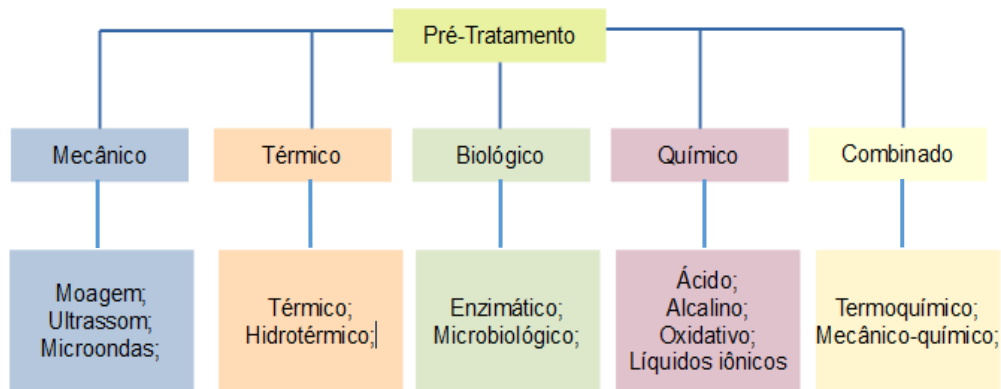
<sup>a</sup> em % de massa seca

<sup>b</sup> do componente mais externo para o mais interno

Fonte: adaptado de D'Hont *et al.* (2017)

Com o crescente interesse em biocombustíveis a partir de microalgas e cianobactérias, a aplicação de diversos métodos de pré-tratamento (Figura 2.6) tem sido investigada para se atingir altos rendimentos em metano (CÓRDOVA; PASSOS; CHAMY, 2018; DE CARVALHO *et al.*, 2020; KANNAH *et al.*, 2021). Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados como mecânico, térmico, químico, biológico ou combinado, quando dois métodos são usados em sequência.

**Figura 2.6:** Métodos mais comuns de pré-tratamento da biomassa



Fonte: elaboração própria (2021)

### 2.3.1 Pré-tratamento mecânico

O pré-tratamento mecânico abrange métodos físicos que têm por objetivo reduzir o tamanho de partícula (moagem) ou romper a parede celular por meio de danos físicos (ultrassom, microondas), sendo esses dois últimos mais investigados para a biomassa de microalgas e cianobactérias. O tratamento por ultrassom se baseia na cavitação produzida por ondas sonoras ao penetrar as células, rompendo-as de dentro para fora. Apesar de não romperem ligações químicas, as microondas rompem ligações de hidrogênio entre as macromoléculas e alteram a estrutura de proteínas da parede celular, causando o rompimento da mesma (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017; RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Pré-tratamento térmico

A biomassa pode ser submetida a temperaturas  $\leq 100$  °C (pré-tratamento térmico) ou a temperaturas muito elevadas com aumento de pressão (pré-tratamento hidrotérmico) em diferentes tempos (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Diversos estudos mostram que, para aumentar a produção de metano de microalgas, a temperatura aplicada no pré-tratamento térmico está entre 55 e 170 °C (KENDIR ÇAKMAK; UGURLU, 2020; PASSOS; GARCÍA; FERRER, 2013). Altas temperaturas solubilizam



a matéria orgânica e hidrolisam parcialmente macromoléculas como carboidratos, lipídeos e proteínas.

Wilson e Novak (2009) procuraram entender o efeito da temperatura sobre a degradação de carboidratos, lipídeos e proteínas aplicando pré-tratamento térmico sobre amido, celulose, ácidos graxos e albumina. Os autores descobriram que acima de 150°C a degradação das proteínas é acompanhada por geração de amônia; gorduras insaturadas são convertidas a ácidos graxos voláteis, como ácido acético e propiônico; e gorduras saturadas formam ácidos graxos de cadeia longa (WILSON; NOVAK, 2009). Tais observações comprovam que altas temperaturas produzem compostos inibitórios ao metabolismo dos microrganismos anaeróbios. Por este motivo, verifica-se uma redução da digestibilidade da biomassa pré-tratada em condições mais severas de temperatura em comparação a condições mais brandas (MENDEZ; MAHDY; BALLESTEROS; *et al.*, 2014).

### **2.3.3 Pré-tratamento biológico**

O pré-tratamento biológico pode ser realizado de duas maneiras: por adição de enzimas ou microrganismos hidrolíticos vivos, como bactérias e fungos. As celulases são as enzimas mais investigadas para o pré-tratamento enzimático de espécies cuja parede celular é composta por celulose e hemicelulose, como *Chlorella* sp e *Chlorococcum* sp. (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). A vantagem do pré-tratamento biológico é que não há formação de subprodutos inibitórios para os microrganismos da digestão anaeróbia. No entanto, o mesmo necessita de um tempo de residência mais longo, além do alto custo de produção das enzimas e sua especificidade em relação ao substrato (BOHUTSKYI; BOUWER, 2012).

A escolha da enzima deve levar em consideração tanto a composição da parede celular da biomassa algácea como também a composição intracelular, pois as espécies podem acumular proteínas ou lipídeos. Portanto, é necessário investigar várias enzimas e sua adequação a diferentes tipos de microalgas e macromoléculas (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; BOHUTSKYI; BOUWER, 2012). Além disso, as condições do pré-tratamento enzimático devem ser bem controladas para que alterações em parâmetros como pH e temperatura não causem perda das enzimas (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017).

Quando a digestão anaeróbia é conduzida em dois estágios, isto é, a fase acidogênica e a metanogênica são conduzidas em reatores separados, alguns autores consideram o primeiro estágio como uma forma de tratamento biológico, visto que nele predominam os microrganismos fermentativos que atuarão primeiro sobre a matéria orgânica (ARIUNBAATAR *et al.*, 2014). Segundo esses autores, o estágio de fermentação ainda pode ser auxiliado pela adição de enzimas ou microrganismos hidrolíticos.

A Tabela 2.5 reúne resultados de solubilização e de rendimento em metano da biomassa algácea após pré-tratamentos físico, térmico e biológico.

Tabela 2.5: Métodos de pré-tratamento físico, térmico e biológico de biomassa algácea para produção de metano.

Código	Método	Espécie	Condições do Pré-tratamento	Aumento na solubilização (%)	Rendimento em metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências		
					Sem PT	Com PT	Variação (%)			
U1	Ultrassom	<i>Chlorella sorokiniana</i> 13,8 g/L DQO <sub>T</sub>	220 W, 30 min	28,5 <sup>b</sup>	317,66	458,43	44,3	Córdova <i>et al.</i> (2018)		
U2			400 W, 20 min	33,3 <sup>b</sup>						
U3			400 W, 30 min	43,2 <sup>b</sup>						
U4			400 W, 40 min	56,8 <sup>b</sup>						
U5	Ultrassom	Biomassa mista ( <i>Monoraphidium sp.</i> , <i>Stigeoclonium sp.</i> , <i>Nitzschia sp.</i> , <i>Amphora</i> sp.)	60 W, 30 min	84,0 <sup>c</sup>	147,70	177,20	20,0	Passos <i>et al.</i> (2014)		
U6			70 W, 30 min	91,0 <sup>c</sup>						
U7	Ultrassom	<i>Scenedesmus sp.</i> , 4,48 g/L ST	80 W, 30 min, 128,9 MJ/kg ST	8,0 <sup>a</sup>	81,80 <sup>j</sup>	153,50 <sup>j</sup>	87,7	González-Fernández <i>et al.</i> (2012a)		
U8	Ultrassom	Biomassa mista ( <i>Nitzschia sp.</i> , <i>Stigeoclonium sp.</i> , <i>Navicula sp.</i> , <i>Monoraphidium sp.</i> ) 31,49 g/L ST	70 W, 30 min, 20 kHz, 27 MJ/kg TS	9,5 <sup>c</sup>	105,6	113,7	8,0	Passos <i>et al.</i> (2015)		
M1	Microondas		900 W, 3 min, 34,3 MJ/kg ST	9,8 <sup>c</sup>					127,70	21,0
M2	Microondas	Biomassa mista de microalgas de lagoas de alta taxa, 16,7 g/L DQO <sub>T</sub>	300 W, 9 min, 64.400 kJ/kg ST	7,5 <sup>d</sup>	117,63	167,24	60,1	Passos <i>et al.</i> (2013)		
M3			600 W, 4,5 min, 64.400 kJ/kg ST	7,4 <sup>d</sup>					210,06	78,6
M4			900 W, 3 min, 64.400 kJ/kg ST	8,1 <sup>d</sup>						
M5	Microondas	Biomassa mista de microalgas de lagoas de alta taxa, 22,0 g/L DQO <sub>T</sub>	900 W, 3 min, 70.000 kJ/kg SV	140,0 <sup>a</sup>	170,00	270,00	58,8	Passos <i>et al.</i> (2014)		
T1	Térmico	<i>Chlorella sorokiniana</i> , 13,8 g/L DQO <sub>T</sub>	80 °C, 20 min	6,6 <sup>b</sup>	317,66	374,81	18,0	Córdova <i>et al.</i> (2018)		
T2	Térmico	Biomassa mista de microalgas de lagoa de alta taxa 17,9 g/L DQO <sub>T</sub>	55 °C, 10h	402,0 <sup>e</sup>	111,00	124,59	13,0	Passos <i>et al.</i> (2013)		
T3			75 °C, 10h	1058,0 <sup>e</sup>					154,57	40,0
T4			95 °C, 10h	1184 <sup>e</sup>						

Código	Método	Espécie	Condições do Pré-tratamento	Aumento na solubilização (%)	Rendimento em metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
					Sem PT	Com PT	Varição (%)	
T5	Térmico	<i>Scenedesmus sp</i> 4,48 g/L ST	70 °C, 25 min	90,0 <sup>a</sup>	81,80 <sup>j</sup>	89,3 <sup>j</sup>	9,0	González-Fernández <i>et al.</i> (2012a)
T6			80 °C, 25 min	130,0 <sup>a</sup>		128,7 <sup>j</sup>	57,0	
T7	Térmico	<i>Scenedesmus sp.</i> 14,0 g DQO <sub>T</sub> /L	70 °C, 180 min	nd	76,00 <sup>j</sup>	85,00 <sup>j</sup>	11,8	González-Fernández <i>et al.</i> (2012b)
T8			90 °C, 180 min	nd		170,00 <sup>j</sup>	123,7	
T9	Térmico	<i>Chlorella sp.</i> 27,9 g DQO <sub>T</sub> /L	65 °C, 4h	41,0	211,00	297,00	41,0	Scarcelli <i>et al.</i> (2020)
T10	Hidrotérmico	Biomassa mista de microalgas de lagoa de alta taxa 2,5% ST	110 °C, 1,2 bar, 15 min	8,0 <sup>c</sup>	120,00	150,00	25,0	Passos e Ferrer (2015)
T11			110 °C, 1,2 bar, 30 min	8,8 <sup>c</sup>		140,00	17,0	
T12			130 °C, 1,7 bar, 15 min	15,0 <sup>c</sup>		170,00	42,0	
T13			130 °C, 1,7 bar, 30 min	13,3 <sup>c</sup>		160,00	33,0	
T14	Hidrotérmico	<i>Chlorella vulgaris</i> 32,1 g/L DQO <sub>T</sub>	140 °C, 3 bar, 10 min, 350 rpm	42,0 <sup>f</sup>	156,40 <sup>j</sup>	219,80 <sup>j</sup>	40,0	Mendez <i>et al.</i> (2014)
T15			160 °C, 6 bar, 10 min, 350 rpm	54,0 <sup>f</sup>		256,30 <sup>j</sup>	64,0	
T16			180 °C, 10 bar, 10 min, 350 rpm	69,0 <sup>f</sup>		226,50 <sup>j</sup>	45,0	
T17	Hidrotérmico	<i>Scenedesmus obliquus</i> 20 g/L ST	165 °C, 7 bar, 30 min	40,0 <sup>g</sup>	159,00	383,60	141,3	Ometto <i>et al.</i> (2014)
T18	Hidrotérmico (com energia solar)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , 0,961 g ST/g peso seco	155 °C, 30 min, 40L/h (semi-contínuo)	nd	221,70	348,00	57,0	Xiao <i>et al.</i> (2019)
E1	Enzimático	<i>Scenedesmus obliquus</i> , 25 mg DQOs/g ST	Mix de celulase + endogalactouronase, 17,5 U/g ST, 50 °C, 24h	35,0 a 45,0% <sup>g</sup>	159,00	897,75	464,6	Ometto <i>et al.</i> (2014)
E2		<i>Scenedesmus obliquus</i> , 25 mg DQOs/g ST	Mix de estearase + protease, 12,5 U/g ST, 50 °C, 24h		159,00	617,70	288,5	
E3		<i>Chlorella sorokiniana</i> , 95 mg DQOs/g ST	Mix de celulase + endogalactouronase, 17,5 U/g ST, 50°C, 24h  Mix de estearase + protease mix, 7,5 U/g ST, 50°C, 24h		169,30	532,68	214,6	

Código	Método	Espécie	Condições do Pré-tratamento	Aumento na solubilização (%)	Rendimento em metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
					Sem PT	Com PT	Varição (%)	
E4		<i>Chlorella sorokiniana</i> , 95 mg DQOs/g ST	Mix de celulase + endogalacturonase, 12,5 U/g ST, 50°C, 24h		169,30	486,08	187,1	
E5		<i>Arthrospira maxima</i> , 300 mg DQOs/g ST			111,00	879,60	689,7	
E6		<i>Arthrospira maxima</i> , 300 mg DQOs/g ST		Miz de estearase + protease, 7,5 U/g ST, 50°C, 24h	111,00	927,00	735,1	
E7	Enzimático	<i>Porphyridium cruentum</i> , 3,4 g DQO <sub>T</sub> /L	Protease 0,5 mL/g massa seca, pH 8.0 – 8.5, 55°C, 9h	32,2 <sup>h</sup>	130,00	230,00	77,0	Çakmak e Urgulu (2020)
E8	Enzimático	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Coquetel de enzimas comerciais, 1% E/S, pH 4,8, 24h	42,0 <sup>i</sup>	317,66	430,80	35,6	Córdova <i>et al.</i> (2019)
E9			Coquetel de enzimas comerciais 1% E/S, pH 4,8, 24h	48,0 <sup>i</sup>		440,70	38,7	
E10			Celulase comercial, 1% E/S, pH 4,8, 24h	36,0 <sup>i</sup>		552,66	74,0	
E11			Celulase comercial, 1% E/S, pH 7,0, 24h	34,0 <sup>i</sup>		545,68	71,0	
E12			Coquetel de enzimas comerciais, 1% E/S, pH 7,0, 24h	50,0 <sup>i</sup>		570,84	70,0	
E13	Biológico	Biomassa mista de cianobactérias e microalgas composta majoritariamente por <i>Oocystis</i> sp. 31.3 g/L DQO <sub>T</sub>	100 U/L caldo de lacase produzido por <i>Trametes versicolor</i> , 100 rpm, 20 min.,	nd	83,0	144,00	20,0	Hom-Diaz <i>et al.</i> (2016)
E14			100 U/L lacase comercial, 20 min., 100 rpm, 25°C			100,00	74,0	

Código	Método	Espécie	Condições do Pré-tratamento	Aumento na solubilização (%)	Rendimento em metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
					Sem PT	Com PT	Varição (%)	
E15	Biológico	<i>Scenedesmus</i> sp. 60.9 g/L DQO <sub>T</sub>	TSAD, pré-tratamento biológico adicionando microrganismos do rúmen ao primeiro estágio, reator: 40 d, TRS = 7 d, TRH = 7 d.	nd	nd	214,00	nd	Giménez <i>et al.</i> (2017)

<sup>a</sup>  $S (\%) = (DQO_{Sf} * 100) / (DQO_{T0})$  [DQOs = demanda química de oxigênio solúvel; DQO<sub>T</sub> = demanda química de oxigênio total; 0 = antes do pré-tratamento, f= após pré-tratamento]

<sup>b</sup>  $S (\%) = (SSV_f * 100) / (SSV_0)$  [SSV = sólidos suspensos voláteis, 0 = antes do pré-tratamento, f= após pré-tratamento]

<sup>c</sup>  $S (\%) = [(SV_{Sf} - SV_{S0}) / (SV - SV_{S0})] * 100$  [SVs = sólidos voláteis solúveis, SV = sólidos voláteis totais, 0 = antes do pré-tratamento, f= após pré-tratamento]

<sup>d</sup>  $S (\%) = (SV_{Sf}) / SV$  [SVs = sólidos voláteis solúveis, SV = sólidos voláteis totais, f= após pré-tratamento]

<sup>e</sup>  $S (\%) = \{[(SV_{Sf} / SV) - (SV_{S0} / SV)] / (SV_{S0} / SV)\} * 100$  [SVs = sólidos voláteis solúveis, SV = sólidos voláteis totais, 0 = antes do pré-tratamento, f= após pré-tratamento]

<sup>f</sup> em termos de carboidratos solúveis

<sup>g</sup> em termos da razão g DQOs/g ST [ST = sólidos totais]

<sup>h</sup> em termos da razão g DQOs/g massa seca

<sup>i</sup>  $S (\%) = [(sSSV_f - sSSV_0) / sSSV_0] * 100$  [SSVs = sólidos suspensos voláteis solúveis, 0 = antes do pré-tratamento, f= após pré-tratamento]

<sup>j</sup> NmL CH<sub>4</sub>/g DQO

PT= pré-tratamento; nd = não disponível, E/S = enzima/substrato, TSAD = digestão anaeróbia em dois estágios (*two-stage anaerobic digestion*)

U = ultrassom; M = microondas; T = térmico; E = enzimático ou biológico

### 2.3.4 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico pode ser realizado empregando álcalis, ácido, agente oxidante, além de novos reagentes, como os líquidos iônicos. Os reagentes são capazes de solubilizar tanto os componentes da parede celular quanto intracelulares, como lipídeos e proteínas. A solubilização da matéria orgânica por este método tem sido extensamente estudada, sendo a concentração do reagente, a concentração de biomassa, a temperatura e o tempo de contato da biomassa com o reagente os fatores de maior influência no pré-tratamento químico (D'HONDT *et al.*, 2017; LÓPEZ TORRES; ESPINOSA LLORÉNS, 2008). Esses fatores e seus efeitos na solubilização da biomassa são discutidos no item 2.3.6.

De um modo geral, as vantagens do pré-tratamento químico são o alto grau de solubilização e baixa intensidade energética. Já as desvantagens são o custo dos reagentes, alteração no pH do digestor, possível inibição ou mesmo toxicidade aos microrganismos metanogênicos devido ao acúmulo de íons ou através da formação de intermediários, e corrosão dos equipamentos (RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

#### a) Pré-tratamento com ácido

Este método é bastante empregado para biomassas lignocelulósicas devido à sua eficiência em despolimerizar celulose e hemicelulose, convertendo-as em açúcares de menor massa molecular (ARIUNBAATAR *et al.*, 2014). O pré-tratamento ácido pode empregar ácido concentrado ou diluído. Quando ácido concentrado é empregado, a reação do mesmo com os açúcares pode formar furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) (AMIN *et al.*, 2017; BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014). Estudos reportam que inibição do crescimento microbiano e da atividade metanogênica durante a digestão anaeróbia, tanto em condições mesofílicas como termofílicas, ocorre a partir de 2 g/L de furfural ou 5-hidroximetilfurfural (GHASIMI *et al.*, 2016).

O emprego de ácido concentrado implica em maior eficiência na degradação dos carboidratos da biomassa, mas também na formação de intermediários tóxicos e corrosão nos equipamentos, exigindo reatores de materiais mais resistentes (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Após o pré-tratamento da biomassa mista de *Chlorella* e *Monoraphidium* sp. com HCl 1,25% a 80 °C por 2 h foi observada a presença de 3,8 mg/L de furfural. A concentração de furfural aumentou para 6,9 mg/L quando a concentração de HCl passou a 2,0%, mantendo as mesmas condições de temperatura

(PASSOS *et al.*, 2016). Na última condição, também foram encontrados 1,3 mg/L de HMF. Apesar de tais concentrações não interferirem na digestão anaeróbia, nota-se que maior quantidade dos produtos de degradação é formada na presença de mais ácido.

Até o momento, o pré-tratamento ácido da biomassa algácea em temperatura ambiente tem sido pouco explorado visando à produção de metano. A maioria dos estudos com esse método é voltado para a produção de etanol. Em temperatura ambiente, Sposob *et al.* (2020) submeteram uma biomassa de microalgas, após extração de lipídeos, ao pré-tratamento ácido. A maior solubilização da matéria orgânica (24%) foi obtida com pré-tratamento com HCl em pH 1. Mendez *et al.* (2013) reportaram um aumento de 2,3 vezes na solubilização de carboidratos de *Chlorella vulgaris* pré-tratada com ácido sulfúrico em temperatura ambiente. Cheng *et al.* (2018) alcançaram um grau de solubilização de 11% com o pré-tratamento de *Oscillatoria tenuis* com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M em pH 2 e temperatura ambiente.

#### b) Pré-tratamento com álcalis

A solubilização da matéria orgânica por adição de álcalis ocorre devido às diversas reações entre o reagente alcalino e os componentes da biomassa, como saponificação dos ácidos urônicos e de ésteres, reações com grupos carboxílicos e a neutralização de intermediários ácidos formados durante a degradação (PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999). Os álcalis aumentam a área superficial específica da biomassa ao causar inchaço (*swelling*) após as reações de saponificação (ATELGE *et al.*, 2020; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017), favorecendo o acesso aos microrganismos digestores (MAHDY *et al.*, 2014a), além de desnaturar e solubilizar as proteínas (D'HONDT *et al.*, 2017; MENDEZ *et al.*, 2013). Melhores resultados de solubilização de biomassa são obtidos quando se empregam bases monovalentes, uma vez que as bases divalentes se dissolvem parcialmente no meio (PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999).

### 2.3.5 Pré-tratamento termoquímico

Ambos os pré-tratamentos ácido e alcalino da biomassa algácea têm sido pouco explorados à temperatura ambiente, sendo a maioria dos estudos conduzidos com temperaturas a partir de 50 °C e/ou superiores a 100 °C (Tabela 2.6). A combinação de um reagente ácido ou alcalino e temperatura permite realizar o pré-tratamento da biomassa sob condições mais brandas e em menor tempo, em



comparação ao pré-tratamento em temperatura ambiente. Tal combinação pode favorecer a diminuição do consumo de energia e custo desta etapa, e permite obter solubilização da biomassa superior à do pré-tratamento químico à temperatura ambiente ou mesmo do tratamento térmico isoladamente (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; MENDEZ; MAHDY; DEMUEZ; *et al.*, 2014; PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017).

Apesar da maior solubilização ser obtida quando a biomassa é submetida a altas temperaturas, a degradação de lipídeos e proteínas, constituintes de cianobactérias e microalgas, pode levar à formação e acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e amônia, ambos inibitórios ao metabolismo de microrganismos metanogênicos (WILSON; NOVAK, 2009). Temperaturas elevadas também favorecem a ocorrência de reações de Maillard entre proteínas, aminoácidos e açúcares redutores, formando novas moléculas complexas. A formação de compostos inibitórios e recalcitrantes explica a menor digestibilidade de biomassas pré-tratadas em temperaturas elevadas, apontando para a necessidade de priorizar o tratamento térmico em temperaturas mais amenas (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017).

Pré-tratamento termoquímico da biomassa, realizado por Penaud *et al.* (1999), a 140 °C por 30 minutos obteve solubilização 10% maior que o pré-tratamento à temperatura ambiente utilizando a mesma concentração de reagente (26,1 g/L NaOH). A Tabela 2.6 apresenta resultados para os pré-tratamentos químico e termoquímico da biomassa algácea.

**Tabela 2.6:**Pré-tratamento químico e termoquímico de biomassa algácea para produção de metano.

Código	Espécie/concentração	Pré-tratamento	Solubilização <sup>a</sup>		Rendimento em Metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
			S <sub>f</sub> (%)	Variação (%)	sem PT	com PT	Variação <sup>b</sup> (%)	
A1	<i>Scenedesmus</i> sp. 6 g/L DQO <sub>T</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1% v/v, 150 °C, 1h	37,5	35,5	130,90	253,10	93,4	Marques <i>et al.</i> (2018)
A2		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2% v/v, 150 °C, 1h	36,9	34,6		nd	nd	
A3		CO <sub>2</sub> borbulhado até pH 2, 150°C, 1h	41,6	39,6		nd	nd	
A4	<i>Spirulina maxima</i> 55,7 g/L DQO <sub>T</sub>	HCl, pH 1, 50 °C, 1h	53,9	87,5	190,00	0,0	-100,0	Samson e Leduy (1983)
A5		HCl, pH 1, 100 °C, 1h	57,4	100,0		60,0	-68,4	
A6		HCl, pH 1, 150 °C, 1h	68,2	137,5		20,0	-89,5	
A7		HCl, pH 3, 50 °C, 1h	39,5	37,5		110,0	-42,1	
A8		HCl, pH 3, 100 °C, 1h	44,9	56,3		140,0	-26,3	
A9		HCl, pH 3, 150 °C, 1h	64,6	125,0		160,0	-15,8	
A10	Biomassa de microalgas após extração de lipídeos 10 g/L DQO <sub>T</sub>	HCl, pH 5, T amb, duração nd	4,5	15,4	104,00 <sup>c</sup>	123,0 <sup>c</sup>	18,3	Sposob <i>et al.</i> (2020)
A11		HCl, pH 4, T amb, duração nd	7,2	84,6		107,0 <sup>c</sup>	2,9	
A12		HCl, pH 3, T amb, duração nd	10,8	176,9		124,0 <sup>c</sup>	19,2	
A13		HCl, pH 2, T amb, duração nd	18,2	366,7		174,0 <sup>c</sup>	67,3	
A14		HCl, pH 1, T amb, duração nd	24,3	523,1		217,0 <sup>c</sup>	108,7	
A15	Biomassa mista de <i>Chlorella</i> sp. e <i>Monoraphidium</i> sp., 14,45 g/L ST	HCl 0,05% m/m, pH 1, 80 °C, 2h	nd	964,0 <sup>d</sup>	78,13	142,50	82,4	Passos <i>et al.</i> , (2016)
A16		HCl 1,25% m/m, pH 0,6, 80 °C, 2h	nd	1008,0 <sup>d</sup>		94,59	21,1	
A17		HCl 2,0% m/m, pH 0,4, 80 °C, 2h	nd	965,8 <sup>d</sup>		89,05	14,0	
A18	<i>Isochrysis galbana</i> 4.5 g/L DQO <sub>T</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2% v/v, 40 °C, 16h	8,4	27,1	9,27	15,90	71,5	Santos <i>et al.</i> (2014)
A19	<i>Chlorella vulgaris</i> 26,2 g/L DQO <sub>T</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2, T amb, duração nd	nd	nd	138,00	113,10	-18,6	Mendez <i>et al.</i> (2013)
A20		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2, 120 °C, 20 min	nd	500 <sup>e</sup>		221,80	59,7	
A21		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2, 120 °C, 40 min	nd	700 <sup>e</sup>		228,80	64,7	
A22	Biomassa mista 2% SV	HCl, pH 2, T amb, 1h	nd	nd	14,00	46,00	228,6	Sukias e Craggs (2006)
A23	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> 32,2 g/L DQO <sub>T</sub>	HCl 3% m/m, 105 °C, 1,7h	60,0	821,4	234,00	296,00	26,5	Rincón-Perez <i>et al.</i> (2019)

Código	Espécie/concentração	Pré-tratamento	Solubilização <sup>a</sup>		Rendimento em Metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
			S <sub>f</sub> (%)	Variação (%)	sem PT	com PT	Variação <sup>b</sup> (%)	
A24	<i>Oscillatoria tenuis</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2; T amb, duração nd	11,0	143,0	191,00	210,00	9,9	Cheng <i>et al.</i> (2018)
A25	Biomassa mista de <i>Desmodemus opoliensis</i> (47%), <i>Navicula reichardtina</i> (27%), <i>Tetradesmus obliquus</i> (12%), <i>Scenedesmus</i> sp. (9%), e <i>Scenedesmus acuminatus</i> (5%) 74,5% SV	HCl 0,5 M, pH 0,3, 121 °C, 1h	40,0	135,3	216,00	205,20	-5,0	Martín-Juárez <i>et al.</i> (2018)
A26		HCl 2,0 M, pH 0,3, 121 °C, 1h	19,0	217,6	208,00	250,00	20,0	
B4	<i>Spirulina maxima</i> 55,7 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH, pH 11, 50 °C, 1h	50,0	75,0	190,00	210,00	10,5	Samson e Leduy (1983)
B5		NaOH, pH 11, 100 °C, 1h	60,0	106,3		220,00	15,8	
B6		NaOH, pH 11, 150 °C, 1h	60,0	112,5		240,00	26,3	
B7		NaOH, pH 13, 50 °C, 1h	55,0	100,0		90,00	-52,6	
B8		NaOH, pH 13, 100 °C, 1h	70,0	137,5		140,00	-26,3	
B9		NaOH, pH 13, 150 °C, 1h	78,0	162,5		80,00	-57,9	
B10	Biomassa mista de microalgas	NaOH 5 g/L, pH 10, T amb, duração nd	63,0	219,0	66,30 <sup>c</sup>	195,00 <sup>c</sup>	194,1	Penaud <i>et al.</i> (1999)
B11	56,2 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 12, T amb, duração nd	75,4	281,8		19,50 <sup>c</sup>	-70,6	
B12	<i>Chlorella</i> sp. 5,6 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 5 g/L, pH 10, 140 °C, 30 min	80,0	305,1		226,20 <sup>c</sup>	241,2	Bohutskyi <i>et al.</i> (2014)
B13		NaOH 20 g/L, pH 10, 140 °C, 30 min	85,1	330,4		12,48 <sup>c</sup>	-81,2	
B14		NaOH 13,7 g/L, pH 13, T amb, duração nd	20,0	10,0	nd	nd	-10,0 <sup>f</sup>	
B15		<i>Nannochloropsis</i> sp. 51 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 10,8 g/L, pH 14, T amb, duração nd	30,0	20,0			
B16	<i>T. weissflogii</i> 46,1 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 13, T amb, duração nd	60,0	-1,2			20,0 <sup>f</sup>	
B17		NaOH 7,8 g/L, pH 13, T amb, duração nd	60,0	38,2			10,0 <sup>f</sup>	
B18	<i>Tetraselmis</i> sp. 42,2 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 14, T amb, duração nd	70,0	80,9			5,0 <sup>f</sup>	

Código	Espécie/concentração	Pré-tratamento	Solubilização <sup>a</sup>		Rendimento em Metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
			S <sub>f</sub> (%)	Variação (%)	sem PT	com PT	Variação <sup>b</sup> (%)	
B19	<i>Pavlova_cp</i> sp. 56,1 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 13,7 g/L, pH 12,5, T amb, duração nd	70,0	10,0			-20,0 <sup>f</sup>	
B20	<i>Chlorella</i> sp. 45,6 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 13, 120 °C, 30 min	80,0	488,4			30,0 <sup>f</sup>	
B21	<i>Nannochloropsis</i> 51 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 14, 120 °C, 30 min	95,0	285,7			40,0 <sup>f</sup>	
B22	<i>T. weissflogii</i> 46 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 12, 120 °C, 30 min	60,0	-1,2			15,0 <sup>f</sup>	
B23	<i>Tetraselmis</i> sp. 42,2 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 6 g/L, pH 13, 120 °C, 30 min	90,0	126,1			5,0 <sup>f</sup>	
B24	<i>Pavlova_cp</i> sp. 56,1 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 13, 120 °C, 30 min	90,0	53,5			5,0 <sup>f</sup>	
B25	<i>Chlorella</i> sp. (30%) e	NaOH, pH 9, T amb, duração nd	5,4	84,8	336,00	363,00	8,0	Cho <i>et al.</i> (2013)
B26	<i>Scenedesmus</i> sp. (70%)	NaOH, pH 11, T amb, duração nd	5,0	78,1		327,00	-2,7	
B27	12,3 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH, pH 13, T amb, duração nd	20,6	324,5		213,00	-36,6	
B28	<i>Nannochloropsis salina</i> 97% ST	NaOH, pH 11, T amb., duração nd	nd	-	sem geração de metano			Qiu <i>et al.</i> (2020)
B29	<i>Spirulina platensis</i>	NaOH 0,8 g/L, T amb., 12h	55,0	55,5	278,80	289,90	4,0	Du <i>et al.</i> (2020)
B30	60,4 g/L DQO <sub>T</sub>	NaOH 1,6 g/L, T amb., 12h	57,0	56,7		297,50	6,7	
B31		NaOH 4,0 g/L, T amb., 12h	20,0	20,4		294,90	5,8	
B32	Biomassa mista de <i>Chlorella</i> e	CaO 4% m/m, pH 12, T amb., 4 d	10,0	400,0	260,00	282,00	8,5	Solé-Bundó <i>et al.</i> (2017)
B33		CaO 4% m/m, pH 12; 55 °C, 24 h	10,0	400,0		255,00	-1,9	
B34	<i>Scenedesmus</i>	CaO 4% m/m, pH 12, 72 °C, 24 h	15,0	650,0	287,00	10,4		
B35	23,5 g/L DQO <sub>T</sub>	CaO 10% m/m, pH 12, T amb., 4 d	13,0	550,0	259,00	-0,4		
B36		CaO 10% m/m, pH 12, 55 °C, 24 h	20,0	900,0	292,00	12,3		
B37		CaO 10% m/m, pH 12, 72 °C, 24 h	25,0	1150,0	325,00	25,0		
B38		<i>Chlorella</i> sp.	NaOH 0,05%, 50 °C, 24h	15,8	139,4	137,17	110,00 <sup>c</sup>	
B39		NaOH 2,0%, 50 °C, 24h	16,2	145,5	125,00 <sup>c</sup>		-8,9	
B40		NaOH 5,0%, 50 °C, 24h	18,2	175,8	155,00 <sup>c</sup>		13,0	
B41		NaOH 0,05%, 50 °C, 48h	15,8	139,4	130,00 <sup>c</sup>		-5,2	

Código	Espécie/concentração	Pré-tratamento	Solubilização <sup>a</sup>		Rendimento em Metano (NmL CH <sub>4</sub> /g SV)			Referências
			S <sub>f</sub> (%)	Variação (%)	sem PT	com PT	Variação <sup>b</sup> (%)	
B42		NaOH 2,0%, 50 °C, 48h	17,6	166,7		160,00 <sup>c</sup>	16,6	
B43		NaOH 5,0%, 50 °C, 48h	19,8	200,0		135,00 <sup>c</sup>	-1,6	
B44	<i>Scenedesmus</i> sp.	NaOH 0,05%, 50 °C, 24h	4,1	115,8	135,00 <sup>c</sup>	150,00 <sup>c</sup>	11,1	Mahdy <i>et al.</i> (2014)
B45		NaOH 2,0%, 50 °C, 24h	5,1	168,4		162,00 <sup>c</sup>	22,2	
B46		NaOH 5,0%, 50 °C, 24h	16,8	784,2		146,00 <sup>c</sup>	20 <sup>f</sup>	
B47		NaOH 0,05%, 50 °C, 48h	4,7	147,4		140,00 <sup>c</sup>	8,2	
B48		NaOH 2,0%, 50 °C, 48h	7,8	310,5		138,00 <sup>c</sup>	3,7	
B49		NaOH 5,0%, 50 °C, 48h	17,7	669,6			2,2	
B50		Biomass mista de <i>Chlorella</i> sp.	KOH 0,5%; pH 12,6, 80 °C, 2h	nd		1943,5 <sup>d</sup>	78,13	
B51	KOH 1,25%; pH 12,6, 80 °C, 2h		nd	2043,5 <sup>d</sup>	100,14	28,0		
B52	e <i>Monoraphidium</i> sp. 14,45 g/L DQO <sub>T</sub>		KOH 2,0%; pH 12,6, 80 °C, 2h	nd	2184,7 <sup>d</sup>	80,78		3,4
B53	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> 94,29 g ST/L	2% m/m biomassa/solução alcalina de	15,4	100,0 <sup>a</sup>	155,00	208,40	34,5	Candia-Lomeli <i>et al.</i> (2022)
B54		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1,25% v/v), 50 °C, 1,5h NaOH 4,0 M, pH 10, 120 °C, 20 min	27,0	251,0 <sup>a</sup>		227,10	46,5	

<sup>a</sup> informado nos trabalhos originais

<sup>a</sup> calculado neste trabalho: S<sub>0</sub> e S<sub>f</sub> = solubilização antes e depois do pré-tratamento. S<sub>0</sub> (%) = (DQO<sub>S0</sub>/(DQO<sub>T0</sub>))\*100; S<sub>f</sub> (%) = (DQO<sub>Sf</sub>/(DQO<sub>Tf</sub>))\*100; DQO<sub>T</sub> = DQO total (g/L); DQO<sub>S0</sub> = DQO solúvel (g/L) antes do pré-tratamento; DQO<sub>Sf</sub> = DQO solúvel (g/L) após pré-tratamento; aumento na solubilização Sp (%) = [(S<sub>0</sub>/S<sub>f</sub>) - 1]\*100

<sup>b</sup> calculado neste trabalho: Aumento no rendimento em metano (Y<sub>p</sub>) (%) = [(Y<sub>CH<sub>4</sub>-PT</sub>/Y<sub>CH<sub>4</sub>-B</sub>)-1]\*100 Y<sub>CH<sub>4</sub>-B</sub> = rendimento em metano da biomassa sem pré-tratamento, Y<sub>CH<sub>4</sub>-PT</sub> = rendimento em metano da biomassa após pré-tratamento

<sup>c</sup> NmL CH<sub>4</sub>/g DQO

T amb. = temperatura ambiente; nd = não disponível

A = pré-tratamento com ácido; B = pré-tratamento com álcalis

### 2.3.6 Influência das condições de pré-tratamento químico e termoquímico sobre a solubilização da biomassa algácea

#### a) Temperatura e Tempo

Em geral, temperaturas superiores a 100°C permitem boas solubilizações em períodos de 20 minutos a 2 horas (Tabela 2.6). Diferentes espécies de microalgas atingiram solubilizações de 60% a 95% após 30 min com NaOH (6-20 g/L) a 120°C (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014). Em temperaturas mais amenas, o tempo de contato não tem muita influência no resultado da solubilização. Como exemplo, o pré-tratamento de uma biomassa mista de *Chlorella* e *Scenedesmus* com CaO (10% m/m) precisou de 4 dias para atingir 13% de solubilização à temperatura ambiente, enquanto 25% foi alcançada com a mesma concentração do reagente após 24 h a 72 °C (SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017). Já o pré-tratamento com NaOH (5% m/m) a 50 °C resultou em solubilizações de 18,2% e 16,2% após 24 h, e de 19,8% e 17,7% após 48 h para *Chlorella* e *Scenedesmus*, respectivamente (MAHDY *et al.*, 2014a).

#### b) Concentração do reagente

Independentemente do tipo de base ou ácido escolhidos para realizar o pré-tratamento, alguns autores têm observado que, a partir de uma determinada concentração de reagente, a solubilização da biomassa tende a se estabilizar, ou mesmo a diminuir. Penaud *et al.* (1999) realizaram pré-tratamento alcalino variando a concentração de NaOH de 0 a 26 g/L. À temperatura ambiente e empregando 4,6 g/L de NaOH, houve uma solubilização de 63% da biomassa. Na máxima concentração, 26,1 g/L de NaOH, 75,4% de solubilização foi obtida (PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999). Ao realizar o pré-tratamento de *S. platensis* com 0,8 g/L e 1,6 g/L de NaOH, Du *et al.* (2020) obtiveram uma solubilização final de 61%, correspondente a um aumento de 56% em relação à biomassa não tratada, em ambos os casos. Contudo, quando a concentração de reagente foi aumentada para 4,0 g/L, a solubilização se manteve idêntica à da biomassa bruta (DU *et al.*, 2020).

No pré-tratamento ácido de *Scenedesmus*, concentrações de 0,2% e 0,1% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> levaram a resultados semelhantes de solubilização (MARQUES *et al.*, 2018). Por outro lado, o pré-tratamento de biomassa mista de *Chlorella* e *Monoraphidium* sp. com 0,5 a 2,0% m/m de HCl foi observado que as concentrações dos açúcares produzidos na hidrólise de polissacarídeos (glicose, xilose e arabinose)

aumentaram com a concentração de ácido adicionada (PASSOS *et al.*, 2016). Juárez *et al.* (2018) realizaram pré-tratamento termoquímico, a 121 °C por uma hora, de uma biomassa mista de *Desmodemus opoliensis* (47%), *Navicula reichardtiana* (27%), *Tetradesmus obliquus* (12%), *Scenedesmus* sp. (9%) e *Scenedesmus acuminatus* (5%). Ao aumentar a concentração de HCl de 0,5 para 2 mol/L os sólidos voláteis retidos na fração sólida da biomassa hidrolisada foram reduzidos de 40 para 19% (MARTÍN JUÁREZ *et al.*, 2018).

#### c) pH

Em um estudo com soluções com diferentes concentrações de NaOH, mas com pH semelhante (pH 12), foram observadas solubilizações muito próximas (PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999). O pH parece beneficiar a solubilização da biomassa à medida que este caminha em direção a altos valores de acidez e basicidade. Cho *et al.* (2013) avaliaram o pré-tratamento de biomassa algácea mista de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. com NaOH à temperatura ambiente, em pH 9, 11 e 13. A solubilização ficou ao redor de 5,0% após pré-tratamento em pH 9 e 11, enquanto em pH 13 obteve-se uma solubilização final de 25%. Passos *et al.* (2016) investigaram o pré-tratamento de biomassa mista de *Chlorella* e *Monoraphidium* sp. a 80 °C por 2 h, com HCl a pH 1, 0,6 e 0,4, obtendo maior solubilização em pH 0,6.

#### d) Composição da parede celular

Bohutsky *et al.* (2014) investigaram o efeito do pré-tratamento químico e termoquímico com NaOH sobre a digestão anaeróbia de 5 espécies de microalgas: *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp., ambas de parede celular mais rígida; *Thalassiosira weissflogii*, com parede celular composta por sílica; *Tetraselmis* sp., cuja parede celular é composta por glicoproteínas, e *Pavlova*\_cf sp., que não possui parede celular. Todas as 5 espécies foram tratadas com NaOH em concentrações variando de 0 e 20 g/L. À temperatura ambiente, foram observados aumentos de apenas 10 a 20% na solubilização de *Chlorella* e *Nannochloropsis*, com 13,7 g/L e 10,8 g/L de NaOH, respectivamente. Os autores atribuíram a baixa solubilização de *Chlorella* e *Nannochloropsis* ao fato de ambas possuírem parede celular mais complexa e, portanto, mais difícil de ser despolimerizada apenas pela adição de base nas concentrações escolhidas. A solubilização de *Tetraselmis* dobrou, alcançando 72% após o pré-tratamento com 20 g/L de NaOH. As demais espécies apresentaram solubilização semelhante à da biomassa bruta, a qual já superava 50% mesmo antes

do pré-tratamento (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014). Nesse caso, por possuírem paredes mais simples, ou até mesmo não ter parede, como no caso de *Pavlova*\_cf, boa parte da matéria orgânica já se encontrava solúvel e o pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente não trouxe nenhum diferencial.

O tratamento termoquímico, por sua vez, levou a melhores resultados de solubilização que o pré-tratamento químico à temperatura ambiente para quatro das cinco espécies de microalgas analisadas por Bohustkyi *et al.* (2014). Após o pré-tratamento com adição de base e aquecimento em autoclave a 121°C/10 atm por 30 minutos, *Tetraselmis* e *Pavlova* alcançaram 90% de solubilização com 6 g/L e 16,7 g/L de NaOH, respectivamente; ao passo que a solubilização de *Chlorella* e *Nannochloropsis* foi de 80 e 95%, nessa ordem, com a adição de 20 g/L de NaOH em pH 14 (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014).

#### e) Concentração da biomassa algácea

Alzate *et al.* (2012) testaram diferentes concentrações de biomassa na digestão anaeróbia de três tipos de biomassa algácea mista (A, B e C). Segundo os autores, reduzir a concentração de 10 para 3 g ST/kg diminuiu o rendimento final da digestão nos três casos. O aumento da concentração de 10 para 20 g ST/kg causou diminuição no rendimento em metano da digestão da biomassa A, e teve efeito inverso na digestão das biomassas mistas B e C, elevando o rendimento final. Nos experimentos conduzidos por Santos *et al.* (2014), a concentração da biomassa foi o efeito mais significativo para a solubilização da biomassa de *Isochrysis galbana*. Conseqüentemente, maior produção de metano foi obtida na digestão na máxima concentração (4500 mg DQO/L) após o pré-tratamento termoquímico com ácido diluído. O modelo estatístico obtido por Rincón-Pérez *et al.* (2019) mostrou que a concentração de biomassa teve efeito negativo sobre a solubilização; porém, a máxima concentração empregada (30 g ST/L) levou ao maior rendimento em metano (296 mL CH<sub>4</sub>/g SV<sub>iniciais</sub>).

### **2.3.7. Influência do pré-tratamento químico e termoquímico na digestão anaeróbia**

#### a) Solubilização

A Tabela 2.6 apresenta os resultados de solubilização e de aumento no rendimento em metano obtidos após os pré-tratamentos químico e termoquímico da



biomassa algácea. Em geral, espera-se que com mais matéria orgânica disponível após o pré-tratamento, o rendimento em metano seja superior ao da biomassa não tratada. A digestão anaeróbia de uma biomassa de *Scenedesmus* após pré-tratamento com ácido sulfúrico resultou em um aumento de 1,5 vezes no rendimento em metano, quando comparado com o rendimento da biomassa bruta (MARQUES *et al.*, 2018). Por sua vez, o pré-tratamento termoquímico de *Isochrysis galbana* com HCl, seguido da lavagem da biomassa para redução da salinidade, levou a um incremento de 27% na solubilização e de 71,5% no rendimento em metano (SANTOS *et al.*, 2014). Solé-Bundó e colaboradores (2017) alcançaram 25% de solubilização da matéria orgânica após o pré-tratamento termoquímico da biomassa mista de *Chlorella* e *Scenedesmus* com 10% m/m de CaO a 72 °C por 24 h. Nessas condições, o pré-tratamento favoreceu à produção de metano, alcançando um aumento de 25% no rendimento em metano em comparação à digestão da biomassa bruta.

Entretanto, são inúmeros os exemplos encontrados na literatura nos quais o aumento na solubilização de matéria orgânica não necessariamente levou a um maior rendimento em metano, especialmente se as condições aplicadas nos pré-tratamentos químico e termoquímico forem mais severas (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999; SAMSON; LEDUY, 1983). No pré-tratamento termoquímico com ácido realizado por Passos e colaboradores (2016), apesar da maior solubilização ter ocorrido em pH 0,4, o maior rendimento em metano, correspondente a um aumento de 82% em relação à biomassa não tratada, foi obtido com a biomassa pré-tratada em pH 1. Do mesmo modo, quando os autores empregaram KOH como reagente, a biomassa pré-tratada na menor concentração de base apresentou o maior rendimento, 85,7% maior que o da biomassa bruta.

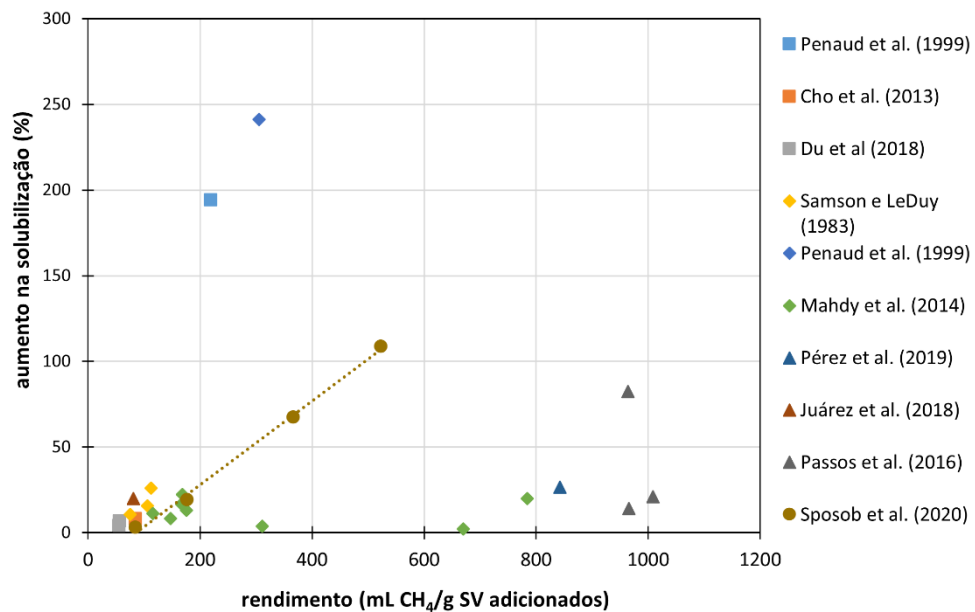
Fica evidente, portanto, que a solubilização da matéria orgânica não se traduz imediatamente em disponibilidade de substratos assimiláveis para os microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia. A maioria dos autores atribui este fato à ocorrência de reações de Maillard entre as moléculas solubilizadas, como aminoácidos e açúcares redutores (PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2017). Tais reações são favorecidas pela alta temperatura e pH extremo dos pré-tratamentos e resultam na formação de compostos recalcitrantes, levando à diminuição da biodegradabilidade da matéria-prima e baixa produção de metano, apesar de mais matéria orgânica se encontrar solúvel após o pré-tratamento

(PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999). Nos pré-tratamentos alcalinos realizados por Cho e colaboradores (2013), apesar da maior solubilização ter sido obtida em pH 13, a biomassa tratada nesta condição teve o menor rendimento em metano, 36,6% inferior ao da biomassa bruta. O maior rendimento em metano (363 NmL CH<sub>4</sub>/g SV<sub>adic</sub>) foi obtido com a biomassa tratada em pH 9, valor 8% superior ao da biomassa bruta.

A mesma tendência foi notada no estudo de Mahdy e colaboradores (2014a) ao empregar tratamento termoquímico a 50 °C com NaOH 5% m/m por 48 h. Os autores obtiveram máxima solubilização para as espécies *Chlorella* e *Scenedesmus*, 19,8% e 17,7%, respectivamente. Mas o rendimento em metano das biomassas tratadas nessa condição (135 e 138 NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub> *Chlorella* e *Scenedesmus*, respectivamente) foi inferior ao resultado das biomassas expostas a condições mais brandas. No caso de *Chlorella* tratada com 2% m/m de NaOH, sua digestão apresentou 16,6% de aumento no rendimento em metano. Por sua vez, a digestão anaeróbia de *Scenedesmus* tratada com 5% m/m de NaOH por 24 h mostrou solubilização de 17% e um aumento de 20% no rendimento em metano.

Na Figura 2.7 estão plotados resultados de aumento de solubilização e rendimento em metano de pré-tratamentos químico e termoquímico com NaOH e HCl (listados na Tabela 2.6) para melhor visualização da relação entre esses dois parâmetros. Observa-se uma relação positiva apenas nos resultados de Sposob (2020). Nos demais estudos, não se pode estabelecer qualquer relação entre aumento de solubilização e rendimento em metano.

**Figura 2.7:** Rendimento em metano (mL CH<sub>4</sub>/g SV adicionados) versus aumento percentual na solubilização da matéria orgânica após o pré-tratamento químico e termoquímico da biomassa algácea – diversos autores.



Fonte: elaboração própria (2021)

#### b) Efeito do acúmulo de amônia

Uma característica da biomassa de microalgas e cianobactérias é o alto teor de proteínas em sua composição, favorecendo uma baixa proporção C/N (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; MAGDALENA; BALLESTEROS; GONZÁLEZ-FERNANDEZ, 2018). Na primeira etapa da digestão anaeróbia, os microrganismos hidrolíticos produzem enzimas extracelulares que hidrolisam proteínas em aminoácidos, liberando amônia no processo (MAGDALENA; BALLESTEROS; GONZÁLEZ-FERNANDEZ, 2018). A amônia pode atuar como inibidor de várias maneiras. Devido à sua permeabilidade pela membrana celular, pode acumular no citoplasma e alterar o pH intracelular. Além disso, pode levar à inibição de enzimas específicas envolvidas na produção de metano (MAGDALENA; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2020; TORRES *et al.*, 2013).

Wilson e Novak (2009) citam especificamente a formação de amônia livre como potencial desvantagem do pré-tratamento térmico de biomassas ricas em proteínas e compostos nitrogenados. No pré-tratamento químico, o mesmo ocorre devido às reações entre as proteínas e o reagente químico empregado (D'HONDT *et al.*, 2017). Tradicionalmente, considera-se que concentrações de nitrogênio amoniacal entre 1.500 e 3.000 mg/L inibem a atividade de microrganismos metanogênicos em valores de pH acima do neutro, enquanto concentrações superiores a 3.000 mg/L são

tóxicas em qualquer faixa de pH (MCCARTY, P. L., 1964). Estudos mais recentes reportam concentrações inibitórias de nitrogênio amoniacal total entre 1.500 e 10.000 mg/L para uma gama de materiais orgânicos submetidos à digestão anaeróbia em condições mesofílicas e termofílicas (JIANG *et al.*, 2019; YENIGÜN; DEMIREL, 2013).

c) Acúmulo de ácidos graxos

Na digestão anaeróbia de biomassa os lipídeos são hidrolisados a ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) por bactérias fermentativas hidrolíticas. Em seguida, estes são convertidos pelos microrganismos acidogênicos em ácidos graxos de cadeia curta, também chamados ácidos graxos voláteis (AGV), como os ácidos acético, propanóico e butanóico que, por sua vez, serão digeridos pelas bactérias acetogênicas. Tais ácidos não são tóxicos por si só, porém, quando há um desequilíbrio no reator que leve ao seu acúmulo, o pH do reator diminui, podendo interferir na biodigestão e na produção de metano (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014).

Já os ácidos graxos de cadeia longa são capazes de desacelerar a atividade de bactérias Gram-negativas, uma vez que adsorvem na parede ou membrana celular, causando problemas de transporte nas células (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). Hanaki, Matsuo e Nagase (1981) testaram a influência da concentração de ácidos graxos de cadeia longa na digestão anaeróbia de substratos sintéticos (acetato, n-butirato, e mistura de ácidos graxos). Aos dois primeiros substratos, os autores adicionaram concentrações variadas de uma mistura de ácidos graxos C10 a C18, de cadeias saturadas e insaturadas. Os experimentos confirmaram que a presença de AGCL em concentrações entre 1000 e 2000 mg/L inibe tanto a degradação dos mesmos pelas bactérias acetogênicas como a degradação do acetato e do n-butirato pelas arqueias metanogênicas. Além disso, foi verificado que, quanto maior a concentração de AGCL, maior a fase *lag* observada antes do início da produção de metano (HANAKI; MATSUO; NAGASE, 1981).

A digestão anaeróbia de *Nannochloropsis salina*, após pré-tratamento com álcalis (pH 11), como método de ruptura da parede celular e recuperação dos lipídeos da biomassa, resultou em menor produção de AGV, acúmulo de AGCL e menor produção de biogás, que não continha metano (QIU *et al.*, 2020). De acordo com os autores, em condições alcalinas há insuficiência de prótons para a reação de  $\beta$ -oxidação conduzida pelos organismos acetogênicos na degradação dos ácidos graxos. Além disso, o pH elevado também causa uma forte inibição do crescimento

dos organismos acetogênicos e metanogênicos, suprimindo as etapas subsequentes à hidrólise na biodigestão (QIU *et al.*, 2020).

d) Acúmulo de sais

No que diz respeito ao pré-tratamento químico e termoquímico, o emprego de álcalis como reagente químico ou na neutralização do pH após pré-tratamento ácido favorece o acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  na biomassa. Além disso, espécies halotolerantes ou oriundas de ambientes salinos em geral apresentam um elevado teor de sais (WARD; LEWIS; GREEN, 2014). Alguns autores indicam que concentrações de  $\text{Na}^+$  maiores que 3 g/L podem ser altamente tóxicas aos microrganismos metanogênicos, enquanto que para o  $\text{K}^+$  concentrações entre 2,5 e 4,5 g/L causam inibição moderada, e a partir de 12 g/L forte inibição (PASSOS *et al.*, 2016).

A toxicidade pode ser mais uma razão que leva à diminuição no rendimento em biogás quando altas concentrações de base são empregadas no pré-tratamento alcalino, apesar de alta solubilização da biomassa ser alcançada. Passos e colaboradores (2016) obtiveram maior produtividade em metano na condição mais branda de pré-tratamento, empregando KOH 0,5% m/m a 80 °C por 2 h. Nessa condição, os autores reportaram 2,9 g/L de  $\text{K}^+$ . Por outro lado, na condição mais severa (2,0% m/m KOH, 80 °C e 2 h) obteve-se o menor rendimento em metano, pois a concentração de  $\text{K}^+$  chegou a 12,8 g/L, indicando um efeito inibitório associado ao acúmulo destes íons.

No estudo realizado por Santos e colaboradores (2014), a digestão anaeróbia da espécie marinha *Isocrysis galbana*, após pré-tratamento com HCl, teve queda de 34% no rendimento em metano, comparado com a digestão da biomassa bruta. Nessa condição, a concentração total de sódio na biomassa foi de 3,6 g/L. Nesse caso, o sódio na biomassa é devido à origem marinha da espécie e também ao uso de NaOH na neutralização do pH após pré-tratamento ácido. Ao empregar  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para neutralizar o pH e adicionar uma etapa de lavagem da biomassa após o pré-tratamento, a concentração de sódio caiu para 65 mg/L e o rendimento em metano aumentou 71,5%.

Com base no exposto, apesar da biomassa algácea ser uma matéria-prima promissora para a produção de metano, características intrínsecas representam

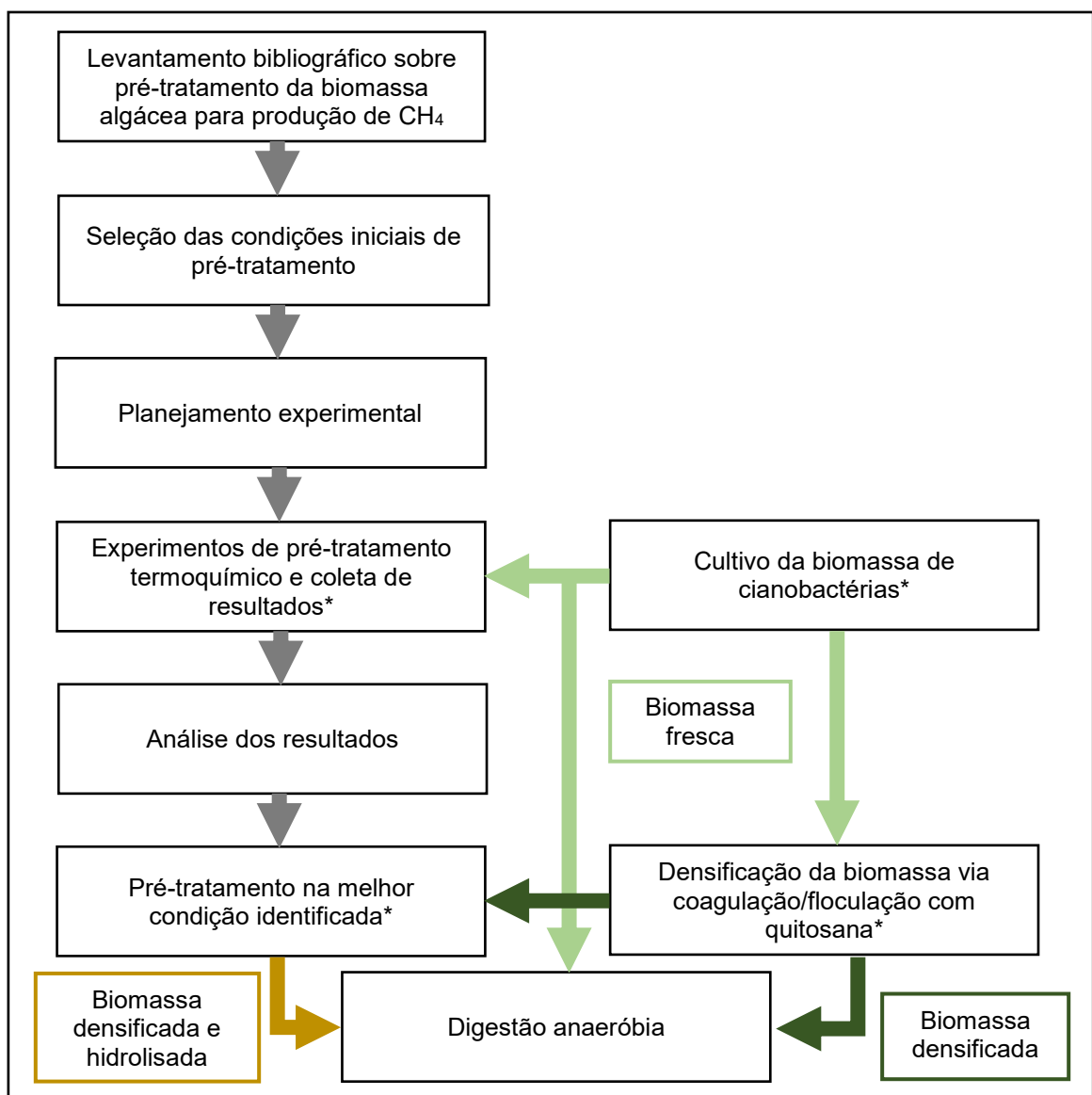
desafios para esta rota. A adoção de um método de separação da biomassa é fundamental para a produção de energia. Como discutido no item 2.1.4, a floculação química é um método de separação sólido-líquido bastante comum em processos em que o líquido é o produto desejado. Entretanto, quando há interesse no processamento da fração sólida (neste caso, a biomassa algácea), é necessário investigar se o agente floculante (que permanece aderido à biomassa) influencia no processo. O estudo de Gouleke *et al.* (1957b) demonstrou que o rendimento em biogás proveniente da biomassa floculada com sulfato de alumínio foi semelhante ao da biomassa concentrada por centrifugação, mostrando não haver efeito negativo do floculante sobre a digestão anaeróbia. Não obstante, esta conclusão não pode ser extrapolada para todos os agentes floculantes e condições operacionais, sendo necessários mais estudos de digestão anaeróbia da biomassa densificada.

Além disso, o pré-tratamento proporciona uma solução para a recalcitrância da biomassa. Todavia, a relação entre aumento na solubilização e rendimento em metano não é bem definida. Frequentemente observa-se que tanto para o pré-tratamento químico realizado em temperatura ambiente quanto para o termoquímico, o aumento na solubilização de matéria orgânica não necessariamente leva a um maior rendimento em biogás, especialmente se as condições aplicadas no pré-tratamento forem mais severas. Em outras palavras, as condições de pré-tratamento em que se alcança maior solubilização podem ser diferentes daquelas que contribuem para um maior rendimento em metano. Portanto, mais estudos são necessários no intuito de se estabelecer uma condição de pré-tratamento que torne viável o emprego de biomassa algácea para obtenção de biogás/metano.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são abordadas as metodologias empregadas para a seleção das condições experimentais do pré-tratamento termoquímico, o cultivo das cianobactérias, os experimentos de pré-tratamento, o procedimento de coagulação/floculação da biomassa com quitosana e o ensaio de digestão anaeróbia da biomassa da cianobactéria. Também são apresentados os métodos analíticos, materiais e reagentes químicos utilizados. O diagrama de blocos da Figura 3.1 apresenta as etapas do trabalho experimental.

**Figura 3.1:** Diagrama de blocos das etapas experimentais



\*foi realizada caracterização da biomassa antes de prosseguir para a etapa seguinte

### 3.1 Análise comparativa entre os métodos de pré-tratamento químico e termoquímico

Um monitoramento da literatura sobre métodos de pré-tratamento da biomassa algácea para produção de metano foi realizado a partir das bases de dados *Scopus* e *Google Scholar*, incluindo trabalhos pioneiros dos anos 1980 e 1990 e mais recentes (a partir de 2013). Os trabalhos acadêmicos selecionados nesta primeira etapa deram origem aos dados compilados nas Tabela 2.5 e 2.6.

A fim de determinar as condições de pré-tratamento químico e termoquímico que efetivamente favorecem a produção de metano via digestão anaeróbia da biomassa algácea, foi realizada uma análise tomando como ponto de partida os dados da Tabela 2.6. Dentre um total de 78 métodos, foram pré-selecionados aqueles que utilizaram NaOH e HCl, considerando seu amplo uso na literatura.

Como forma de avaliar o impacto das condições utilizadas sobre o resultado da digestão anaeróbia, foram calculadas a variação percentual da solubilização ( $S_p$ ) e do rendimento em metano ( $Y_p$ ) obtidos após cada pré-tratamento, em relação à biomassa bruta, sem pré-tratamento. Como diferentes formas de apresentar a solubilização da biomassa foram encontradas na literatura consultada, o grau de solubilização inicial ( $S_0$ ) e final ( $S_f$ ) de cada pré-tratamento foi estabelecido como sendo a razão entre a DQO solúvel e a DQO total da biomassa, informadas nos trabalhos pesquisados, e calculados de acordo com as equações 3.1 e 3.2.

$$S_i (\%) = \frac{DQO_{S_i}}{DQO_{T_i}} * 100 \quad (3.1)$$

$$S_f (\%) = \frac{DQO_{S_f}}{DQO_{T_i}} * 100 \quad (3.2)$$

onde  $S_i$  e  $S_f$  são o grau de solubilização antes e após o pré-tratamento, em %,  $DQO_{T_i}$  (g/L) é a DQO total da biomassa antes do pré-tratamento,  $DQO_{S_i}$  (g/L) é a DQO solúvel da biomassa antes do pré-tratamento e  $DQO_{S_f}$  (g/L) é a DQO solúvel da biomassa após o pré-tratamento.

As equações 3.1 e 3.2 foram aplicadas a todos os pré-tratamentos selecionados, com exceção do pré-tratamento termoquímico com ácido clorídrico realizado por Passos *et al.* (2016). Os autores não expressam a matéria orgânica solubilizada em termos de DQO, mas sim de COT (carbono orgânico total, em mg/L).



Desta forma, a variação na solubilização da matéria orgânica está expressa em termos do aumento percentual na concentração de COT da biomassa após o pré-tratamento.

A variação percentual na solubilização ( $S_p$ ), foi calculada de acordo com a equação 3.3. A variação percentual no rendimento em metano ( $Y_p$ ) foi calculada conforme a equação 3.4, sendo os rendimentos em metano da biomassa bruta ( $Y_{CH_4-B}$ ) e da biomassa pré-tratada ( $Y_{CH_4-PT}$ ) obtidos da literatura.

$$S_p(\%) = \left( \frac{S_f - S_i}{S_i} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

$$Y_p(\%) = \left( \frac{Y_{CH_4PT}}{Y_{CH_4B}} - 1 \right) \times 100 \quad (3.4)$$

Com base nestas variáveis, adotou-se como critério de seleção dos pré-tratamentos: (i) variação na solubilização  $\geq 50\%$  e (ii) variação positiva no rendimento em metano. Por fim, a relação entre as condições de pré-tratamento (concentração de reagente, temperatura e tempo) e as variáveis  $S_p$  e  $Y_p$  foi analisada dentro de quatro categorias de pré-tratamento: a) químico com NaOH; b) termoquímico com NaOH; c) químico com HCl e d) termoquímico com HCl.

Para avaliar diferentes condições de pré-tratamento em termos de temperatura e tempo, empregou-se o fator de severidade combinada. O fator de severidade é um conceito introduzido por Overend e Chornet (1987) originalmente relacionado ao pré-tratamento com explosão a vapor de biomassa lignocelulósica visando à conversão dos polissacarídeos em açúcares mais simples, como glicose e xilose, para posterior produção de etanol (AMIN *et al.*, 2017; FENG, 2014). De acordo com Overend e Chornet, a reação de conversão da hemicelulose em xilose segue uma cinética de primeira ordem, na qual a constante K obedece à lei de Arrhenius. O fator de severidade é dado pelo logaritmo de  $R_0$ , como mostra a equação 3.5.

$$Severidade = \log R_0 \quad (3.5)$$

Onde  $R_0$  é a ordenada da reação.

O fator  $R_0$  combina o efeito da temperatura e do tempo do pré-tratamento hidrotérmico, conforme apresentado na equação 3.6.

$$R_0 = t \times \exp\left(\frac{T_h - T_{ref}}{14,75}\right) \quad (3.6)$$

na qual  $t$  é o tempo do pré-tratamento (em min),  $T_{ref}$  é a temperatura de referência (100 °C),  $T_h$  é a temperatura em que o pré-tratamento é realizado (em °C) e 14,75 é um fator relacionado à energia de ativação do pré-tratamento.

O pré-tratamento químico e termoquímico pode ser intermediado por um catalisador ácido ou alcalino. Assim, o fator de severidade combinado (CS – *combined severity*), apresentado na equação 3.7, foi desenvolvido por Chum *et al.* (1990) para levar em conta o efeito de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na explosão a vapor.

$$\log CS = \log R_0 - pH \quad (3.7)$$

Quando se realiza o pré-tratamento com álcalis, o pH pode ser substituído pelo pOH no cálculo do fator de severidade combinado. É válido ressaltar que, neste trabalho, comparou-se biomassas de diferentes espécies e, conseqüentemente, de composição química diferentes, visto a diversidade das microalgas e cianobactérias. O fator de severidade combinada, no entanto, não contempla estas diferenças, sendo utilizado majoritariamente na avaliação do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Sendo assim, ao empregar o conceito de severidade combinada aos pré-tratamentos da biomassa algácea, obteve-se uma comparação modesta, de forma a complementar as demais análises realizadas.

A eficiência energética dos pré-tratamentos químicos e termoquímicos também foi avaliada e comparada com métodos físicos e biológicos. Nos estudos em que o balanço energético não foi apresentado, a energia requerida para o pré-tratamento foi calculada a partir das informações disponíveis nos trabalhos citados na Tabela 2.6, conforme as equações 3.8 (utilizada para pré-tratamento térmico) e 3.9 (aplicada a pré-tratamentos químicos), a seguir (MARQUES *et al.*, 2018).

$$E_{in} = \left[ \frac{\rho V \gamma (T_p - T_0)}{m_{SV}} \right] + \left[ \frac{k A t (T_p - T_0) \times 0,06}{m_{SV}} \right] \quad (3.8)$$

onde  $E_{in}$  (kJ/g SV ou kJ/g DQO) representa a energia necessária para elevar a temperatura da biomassa da temperatura ambiente ( $T_0 = 25^\circ\text{C}$ ) à temperatura do pré-tratamento ( $T_p$ , °C),  $\rho$  é a densidade do cultivo (considerada a mesma da água, 1,0 kg/L),  $V$  é o volume (1 L),  $\gamma$  é o calor específico (4,18 kJ/kg.°C),  $m_{SV}$  é a massa de biomassa tratada (em g SV ou g DQO),  $k$  é o coeficiente de transferência de calor (1,0

W/m<sup>2</sup>.°C),  $t$  é a duração do pré-tratamento em minutos, e  $A$  é a área superficial do reator (0,061 m<sup>2</sup>), calculada para um reator com volume útil de 1,5 L e relação altura/diâmetro de 2 (MARQUES *et al.*, 2018).

$$E_{in} = \frac{V_R Y_R P_e}{C_S V} \quad (3.9)$$

onde  $E_{in}$  (kJ/g SV ou kJ/g DQO) representa o custo energético do reagente químico (ou enzima, no caso de pré-tratamento biológico) utilizado.  $V_R$  é o volume (L) ou massa (g) de reagente necessário para o pré-tratamento,  $Y_R$  é o preço do reagente (0,16 USD/mL HCl ou 0,11 USD/g NaOH),  $P_e$  é um fator de conversão do custo monetário em energia (27481 kJ/USD) e equivale ao inverso do custo da energia elétrica para o setor industrial,  $C_S$  é a concentração de biomassa (g SV/L ou g DQO/L) e  $V$  é o volume de biomassa tratado (L). O preço dos reagentes foi obtido de fornecedores industriais internacionais para o período de julho/2022 e o custo da energia elétrica foi baseado no custo médio mundial em 2021.

A equação 3.8 considera a energia térmica requerida pelos pré-tratamentos, enquanto a equação 3.9 contabiliza a demanda energética para a produção dos reagentes químicos. Assim, a demanda energética total do pré-tratamento químico e biológico é dada pela equação 3.8, enquanto que para o pré-tratamento termoquímico a demanda é determinada pela soma das equações 3.8 e 3.9. A energia produzida pela digestão anaeróbia da biomassa tratada,  $E_{out}$ , é dada pela equação 3.10:

$$E_{out} = \frac{\eta \Delta P \xi}{10^3} \quad (3.10)$$

Onde  $\eta$  é a eficiência de recuperação da energia em forma de metano (0,9),  $\Delta P$  é o rendimento em metano da biomassa tratada (NmL CH<sub>4</sub>/g SV ou NmL CH<sub>4</sub>/g DQO adicionados) e  $\xi$  é o poder calorífico inferior do CH<sub>4</sub> (35,8 kJ/L CH<sub>4</sub>) (MARQUES *et al.*, 2018).

### 3.2 Cultivo e caracterização da biomassa

A cepa de cianobactéria *Synechococcus subsalsus* utilizada nos experimentos foi obtida do Banco de Microalgas Aidar & Kutner (BMA&K), do Instituto Oceanográfico da USP. Como meio de cultivo para as cianobactérias, utilizou-se o meio líquido BG-11, cuja composição está descrita na Tabela 3.1.

Erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min, seguido de resfriamento até alcançar

a temperatura ambiente. Posteriormente, os meios foram expostos à radiação ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 30 min, juntamente com os materiais necessários para realizar a inoculação (pipetas, ponteiras, proveta e béquer).

**Tabela 3.1:** Composição do meio de cultivo BG-11.

<b>Componente</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
<i>Solução de macronutrientes</i>		
Nitrato de sódio	NaNO <sub>3</sub>	1,500
Fosfato de potássio dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,040
Sulfato de magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
Cloreto de cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
Carbonato de sódio	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,020
<i>Solução de citrato</i>		
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,006
Citrato férrico amoniacal	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,006
EDTA	-	0,001
<i>Solução de metais-traço</i>		
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,860
Cloreto de manganês	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,810
Sulfato de zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
Molibdato de sódio	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,390
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
Cloreto de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,045

Fonte: adaptado de Cyanosite (2022)

A inoculação foi feita em assepsia dentro da câmara de fluxo laminar. De um cultivo preexistente, mediu-se a densidade óptica a 750 nm ( $D.O_{.750}$ ) e retirou-se uma alíquota para ser utilizada como inóculo em cada erlenmeyer do novo cultivo. O volume de inóculo ( $V_{inóculo}$ ) necessário foi calculado de maneira que a densidade óptica inicial do novo cultivo fosse igual a 0,06 (equação 3.11).

$$V_{inóculo} [mL] = 0,06 \times V_{meio} \times \frac{1}{D.O_{.750}} \quad (3.11)$$

Após a inoculação, a cultura de cianobactérias foi incubada em uma incubadora *shaker* refrigerada por 30 dias, a 23 °C ± 1 °C e 150 rpm, com iluminação artificial direta (lâmpada LED branca 15W) em um fotoperíodo de 12h iluminado/12h escuro, controlado por um interruptor automático com *timer*.

A concentração de células no cultivo foi acompanhada medindo-se a densidade óptica (D.O.) a 750 nm. Leituras de densidade óptica foram convertidas em peso seco de biomassa por meio de uma curva-padrão previamente preparada,

relacionando a densidade óptica com a concentração de sólidos suspensos totais (SST) de uma amostra de cultivo de *S. subsalsus*. A equação 3.12 descreve a curva de peso seco resultante, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9947.

$$C = 828,75 \times D.O_{750nm} - 13,997 \quad (3.12)$$

onde C é a concentração de sólidos suspensos totais (SST), em mg/L, e  $D.O_{750nm}$  é a densidade óptica do cultivo medida a 750 nm.

Ao final dos cultivos, a biomassa foi caracterizada por meio de análises de sólidos suspensos totais (SST), demanda química de oxigênio total ( $DQO_T$ ), demanda química de oxigênio solúvel ( $DQO_S$ ) e pH.

### 3.3 Densificação da biomassa

A densificação das cianobactérias foi realizada via coagulação/floculação utilizando quitosana (Sigma-Aldrich ou Polymar) como agente floculante. Este método permite separar as células do meio de cultivo, resultando em uma biomassa muito mais concentrada do que no cultivo fresco.

O procedimento de coagulação/floculação de *S. subsalsus* foi realizado de acordo com as condições ótimas (concentração de quitosana, velocidade de agitação, pH e tempo) indicadas em um estudo anterior (SANTOS, em fase de elaboração), também desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Ambiental da Escola de Química da UFRJ. Neste estudo, verificou-se que as condições ótimas para a coagulação/floculação foram pH 7,0, tempo de mistura rápida (TMR) = 100 rpm/1 min, tempo de mistura lenta (TML) = 40 rpm/15 min e tempo de sedimentação (TS) de 45 min, empregando-se uma relação de 0,3 g quitosana/g SST da biomassa.

A coagulação/floculação foi feita em equipamento *jar-test* Nova Ética 218/1-06. A 150 mL de cultivo adicionou-se 1 mL de solução de quitosana (2,33 g de quitosana previamente solubilizada em ácido acético 1,0% v/v) e iniciou-se a etapa de agitação rápida. Em seguida, procedeu-se com a etapa de agitação lenta. Por fim, a biomassa floculada foi deixada em repouso por 45 min para sedimentar. Ao final deste processo, o sobrenadante foi removido e a biomassa concentrada foi armazenada em tubos Falcon conservados na geladeira (10 °C) para posterior caracterização.

A eficiência de floculação (EF) foi calculada de acordo com a equação 3.13, onde  $D.O_{750nm0}$  representa a densidade óptica do cultivo fresco e  $D.O_{750nmS}$  representa a densidade óptica do sobrenadante após a coagulação/floculação, ambas medidas a 750 nm.

$$EF(\%) = \left( \frac{D \cdot O_{.750nm_0} - D \cdot O_{.750nm_S}}{D \cdot O_{.750nm_0}} \right) \times 100 \quad (3.13)$$

Por fim, a equação 3.14 foi utilizada para avaliar o fator de concentração da biomassa

$$FC = \frac{\left[ \frac{(D \cdot O_{.750nm_0} \times V_0) - (D \cdot O_{.750nm_S} \times V_S)}{V_D} \right]}{D \cdot O_{.750nm_0}} \quad (3.14)$$

onde  $V_S$  = volume de sobrenadante (mL) e  $V_D$  = volume de biomassa densificada (mL).

### 3.4 Pré-tratamento termoquímico da biomassa de *Synechococcus subsalsus*

Para o pré-tratamento termoquímico da biomassa de *S. subsalsus* com ácido clorídrico (HCl), utilizou-se um planejamento composto central com três réplicas no ponto central (C). Este tipo de planejamento permite obter um modelo quadrático considerando os principais fatores que influenciam na variável resposta e as interações entre os termos lineares e quadráticos destes fatores.

O primeiro planejamento teve por objetivo avaliar o efeito das variáveis temperatura, concentração de HCl e concentração de biomassa sobre a solubilização da biomassa. O pré-tratamento foi conduzido em frascos de vidro tipo Schott de 100 mL, contendo 30 mL de biomassa (fresca ou densificada), imersos em um banho de óleo de silicone com temperatura controlada por uma placa aquecedora IKA RCT Basic. Com o auxílio de uma pipeta automática, o volume de HCl necessário foi adicionado aos frascos que, em seguida, foram fechados e colocados no banho. A duração do pré-tratamento (1 ou 4 h) foi marcada no cronômetro a partir do momento em que o sistema atingiu equilíbrio térmico, verificado com um termômetro.

As faixas de valores estabelecidas para cada variável estudada no planejamento foram definidas a partir das conclusões da análise comparativa realizada no item 3.1. Assim, temperaturas de 50°C e 100°C e concentrações de HCl de 0,1% v/v e 1,0% v/v foram selecionadas para os níveis -1 e +1 da matriz do planejamento. Os níveis -1 e +1 estabelecidos para a concentração de biomassa foram a concentração de sólidos suspensos totais (SST) do cultivo fresco (biomassa

diluída) e da biomassa densificada. Tais limites correspondem, respectivamente, a 10,9% e 18,1% SST (em mg SST/100 mL). Os experimentos de pré-tratamento foram realizados nos tempos de 1 e 4 h.

Os valores reais e codificados das variáveis testadas são apresentados na Tabela 3.2. A matriz de experimentos gerada pelo *software* é mostrada na Tabela 3.3. Todos os 18 experimentos de pré-tratamento (H1 a H18) foram realizados durante 1 h e 4 h, totalizando 36 experimentos.

**Tabela 3.2:** Níveis e valores reais das variáveis independentes testadas no Planejamento 1

Variáveis independentes	Níveis e valores reais				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	33,0	50,0	75,0	100,0	117,0
concentração de HCl (% v/v)	0,00	0,10	0,55	1,00	1,20
% SST (mg SST/100 mL)	7,4	10,9	14,5	18,1	21,7

Fonte: elaboração própria (2022)

**Tabela 3.3:** Matriz de experimentos do Planejamento 1.

Experimento	T (°C)	HCl (% v/v)	% SST
H1	75	0,55	7,4
H2	75	1,3	14,5
H3	100	1,0	10,9
H4	50	0,1	10,9
H5	33	0,55	14,5
H6 (C)	75	0,55	14,5
H7	50	1,0	18,1
H8	75	0,55	21,7
H9	100	0,1	18,1
H10	50	1,0	10,9
H11	100	1,0	18,1
H12	100	0,1	10,9
H13	75	0,0	14,5
H14 (C)	75	0,55	14,5
H15	50	0,1	18,1
H16	117	0,55	14,5
H17 (C)	75	0,55	14,5

C = ponto central.

Fonte: elaboração própria (2022)

Considerando as conclusões da análise comparativa e do Planejamento 1 (discutidos na seção 4.4), um segundo planejamento foi realizado contemplando apenas a biomassa densificada, no qual adotou-se temperaturas mais altas e tempo

de pré-tratamento de 2 h. Neste segundo planejamento, um bloco digestor ALFAKIT AT 525 foi utilizado como fonte de aquecimento para tubos Hach de 10 mL, contendo 6,0 mL de biomassa densificada. Com o auxílio de uma pipeta automática, o volume de HCl necessário foi adicionado aos tubos Hach que, em seguida, foram fechados e colocados no bloco digestor. A duração do pré-tratamento (2 h) foi marcada no cronômetro a partir do momento em que o sistema atingiu equilíbrio térmico, verificado no termopar do bloco digestor. Os valores reais e codificados das variáveis testadas no Planejamento 2 são apresentados na Tabela 3.4. A matriz de experimentos gerada pelo *software* para o Planejamento 2 é mostrada na Tabela 3.5, com um total de 13 experimentos.

**Tabela 3.4:** Níveis e valores reais das variáveis independentes testadas no Planejamento 2

Variáveis independentes	Níveis e valores reais				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	90	100	125	150	160
concentração de HCl (% v/v)	0,00	0,10	0,55	1,00	1,20

Fonte: elaboração própria (2022)

**Tabela 3.5:** Matriz de experimentos do Planejamento 2.

Experimento	T (°C)	HCl (% v/v)
H1 (C)	125	0,55
H2	125	1,2
H3 (C)	125	0,55
H4	150	0,1
H5	125	0,0
H6	90	0,55
H7 (C)	125	0,55
H8	100	1,0
H9 (C)	125	0,55
H10 (C)	125	0,55
H11	100	0,1
H12	160	0,55
H13	150	1,0

C = ponto central

Fonte: elaboração própria (2022)

Ao final de cada pré-tratamento, a biomassa hidrolisada foi esfriada até atingir a temperatura ambiente e caracterizada em termos de DQO solúvel e pH.

Como o método de determinação da DQO possui um limite máximo para a concentração de cloreto nas amostras, para cada volume de HCl adicionado à



biomassa, a concentração de cloreto foi calculada estequiometricamente, de acordo com a reação de dissociação do ácido clorídrico em meio aquoso (Reação 3.1):



A concentração de cloreto em todas as condições de pré-tratamento foi inferior à concentração que causa interferência na determinação de DQO (2000 mg Cl<sup>-</sup>/L). No entanto, em alguns casos a diluição da amostra foi necessária para atender o limite de detecção do método de determinação da DQO, empregando-se diluições de 2,5 (biomassa fresca) e 1,67 (biomassa densificada).

Por fim, determinou-se o grau de solubilização ( $S_f$ ) da biomassa em cada condição de pré-tratamento, bem como o aumento percentual na solubilização ( $S_p$ ), calculados de acordo com as equações 3.2 e 3.3 do item 3.1, respectivamente. Os resultados dos planejamentos foram analisados para a variável dependente  $S_p$  no *software Statistica* versão 10.

Pelo modelo estatístico gerado, escolheu-se a condição de pré-tratamento que maximizou  $S_p$  para realizar a hidrólise termoquímica da biomassa de cianobactérias antes dos ensaios de digestão anaeróbia. Como o volume de biomassa necessário era maior, o pré-tratamento foi realizado no bloco digestor de um Determinador de Gordura TE-044 (TECNAL), que comporta 150 mL de biomassa sob temperatura controlada.

Neste caso, o pré-tratamento termoquímico foi realizada com ácido sulfúrico, em substituição ao ácido clorídrico, para evitar a introdução de íons cloreto no meio e inibição da digestão anaeróbia. Contudo, o sulfato introduzido na amostra pode levar à formação de H<sub>2</sub>S e também inibição da digestão anaeróbia. A fim de minimizar a produção de H<sub>2</sub>S durante a digestão anaeróbia, óxido de cálcio (CaO) foi adicionado à biomassa hidrolisada para precipitar o sulfato e, conseqüentemente, eliminar seu efeito inibitório (LIMA, 2020).

### 3.5 Digestão anaeróbia da biomassa de cianobactérias

Três ensaios de digestão anaeróbia da biomassa de *Synechococcus subsalsus* foram realizados empregando como matéria-prima (i) a biomassa do meio de cultivo (BMC); (ii) a biomassa densificada por coagulação/floculação com quitosana (BMD); e (iii) a biomassa densificada e que sofreu pré-tratamento ácido (BMDA).

Os ensaios foram conduzidos em batelada no respirômetro *Gas Endeavor (Bioprocess Control)* utilizando como reatores frascos *Schott* com volume total de 600 mL. Lodo anaeróbio da estação de tratamento de efluentes de uma indústria cervejeira foi utilizado como inóculo na digestão anaeróbia. A caracterização do lodo em termos de sólidos totais e sólidos voláteis foi realizada conforme descrito na seção 3.6.

Como condições iniciais, estabeleceu-se pH entre 6,8 e 7,2; temperatura mesofílica de 35°C; relação inóculo/biomassa de 2 g SV para cada 1 g de DQO (I/S = 2); agitação a 60 rpm em modo intermitente (60s agitando, 60s pausado) e duração de 30 dias, ou até cessar a produção de metano, o que ocorresse primeiro.

A Tabela 3.6 apresenta a concentração e volume de biomassa e de lodo utilizados em cada ensaio de forma a obter uma razão I/S=2.

**Tabela 3.6:** Concentrações e volumes de biomassa e lodo nos ensaios de digestão anaeróbia.

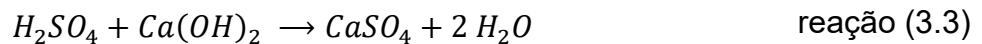
<b>Tipo de biomassa</b>	<b>Concentração de biomassa (g DQO/L)</b>	<b>Concentração de lodo (g SV/L)</b>	<b>Volume de biomassa (mL)</b>	<b>Volume de lodo (mL)</b>
Biomassa do cultivo (BMC)	0,442	13,95	150	9,5
Biomassa densificada (BMD)	10,2		50	73,4
Biomassa densificada e pré-tratada com ácido (BMDA)	9,2		50	81,6

Fonte: elaboração própria (2022)

As misturas de biomassa com o lodo anaeróbio foram preparadas em volume necessário para ensaios em duplicata ou triplicata, sob agitação magnética para garantir homogeneização das alíquotas tomadas. Antes da adição do lodo, o pH da biomassa foi medido em pHmetro digital (QUIMIS) e ajustado para aproximadamente

6,0 com ácido sulfúrico 0,5 mol/L. Após adição do lodo, verificou-se o pH e ajustou-se novamente para mantê-lo na faixa de 6,8 a 7,2.

A fim de minimizar a produção de  $H_2S$  durante a digestão anaeróbia, óxido de cálcio (CaO) foi adicionado à mistura para precipitar o sulfato oriundo do ácido sulfúrico empregado no pré-tratamento termoquímico da biomassa e no ajuste de pH da biomassa pré-tratada. A massa de CaO necessária foi calculada estequiometricamente de acordo com as reações 3.2 e 3.3.



Além das misturas, foram preparados brancos em triplicata utilizando o mesmo volume de lodo empregado em cada ensaio e substituindo a biomassa por água destilada. É comum que restos de matéria orgânica fiquem misturados ao inóculo anaeróbio proveniente de reatores em operação, o que resulta em produção de metano mesmo na ausência de matéria-prima. Assim, a análise dos brancos foi feita para avaliar a atividade endógena do lodo.

Uma vez prontas, as misturas e os brancos foram fracionados nos frascos *Schott* e o teste foi montado no respirômetro *Gas Endeavour*. Hastes agitadoras foram acopladas em cada frasco e estes foram colocados em banho-maria a 35°C durante todo o ensaio. Em seguida, conectou-se os frascos à unidade de absorção de gás, onde o gás carbônico gerado fica retido e apenas o metano prossegue para o sistema de medição do equipamento. Por fim, realizou-se a purga dos frascos com nitrogênio gasoso durante um minuto a fim de expulsar quaisquer gases dissolvidos e garantir um ambiente anaeróbio dentro dos reatores.

O equipamento registra o volume acumulado de metano produzido ao longo da digestão, fornecendo resultados nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP,  $T = 273 \text{ K}$  e pressão de 1 atm). Para obter o volume de metano produzido exclusivamente pela digestão anaeróbia da biomassa, a média das triplicatas (ou duplicatas) dos brancos foi subtraída da média das triplicatas (ou duplicatas) dos ensaios com matéria-prima. O rendimento específico ( $Y_{CH_4}$ ) foi obtido dividindo-se o volume de metano (em NmL) pela massa de biomassa inserida no ensaio ( $DQO_{adic}$ ). Assim, obteve-se uma curva de produção de metano para os 30 dias de ensaio.

O modelo de Gompertz (equação 3.15) e o modelo de Gompertz modificado (MGM, equação 3.16) são dois modelos comumente utilizados para avaliar a cinética

da digestão anaeróbia, uma vez que seus parâmetros representam matematicamente as fases do crescimento microbiano (GOMES; STRANGFELD; MEYER, 2021).

$$Y_G [NmL CH_4/gDQO_{in}] = A \times \exp(-\mu_m \times \exp(-\lambda \times t)) \quad (3.15)$$

$$Y_{MGM} [NmL CH_4/gDQO_{in}] = A \times \exp\left\{-\exp\left[\left(\frac{\mu_m \times e}{A}\right) \times (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (3.16)$$

onde  $Y_G$  = rendimento em metano de acordo com modelo de Gompertz (NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>);  $Y_{MGM}$  = rendimento em metano de acordo com modelo de Gompertz modificado (NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>);  $A$  = rendimento máximo (NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>);  $\mu_m$  = taxa máxima de produção específica de metano (NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>.dia);  $\lambda$  = duração da fase *lag* (dia);  $t$  = tempo (dia); e  $e$  = número de Euler.

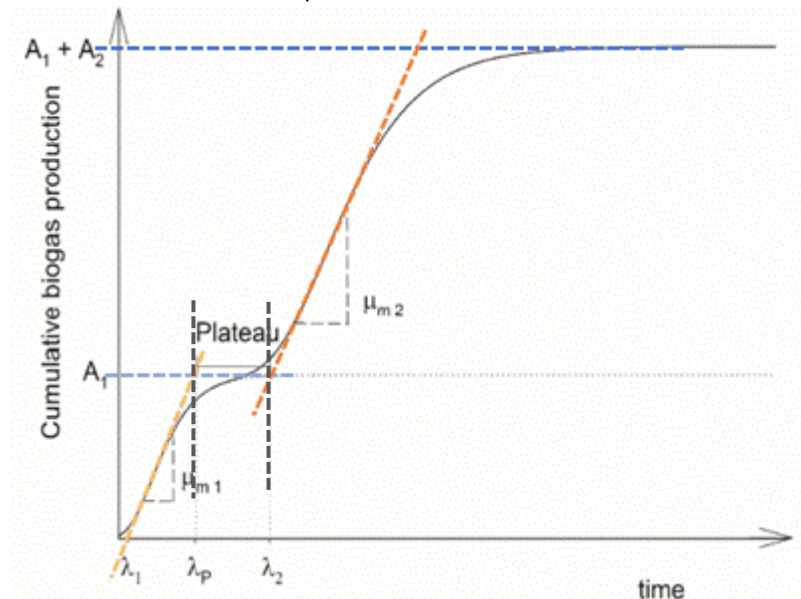
Os parâmetros dos modelos podem ser calculados minimizando a soma do erro normalizado, dado pela equação 3.17.

$$erro\ normalizado = \left(\frac{Y_m - Y_e}{Y_m}\right)^2 \quad (3.17)$$

onde  $Y_m$  = rendimento em metano previsto pelo modelo (NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>);  $Y_e$  = rendimento em metano experimental (NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>).

Alternativamente, os parâmetros cinéticos podem ser estimados graficamente através da curva de rendimento específico por tempo. A taxa máxima de produção específica de metano ( $\mu$ ) é determinada pelo coeficiente angular da reta ajustada aos pontos do segmento crescente do gráfico, enquanto a intersecção desta reta com o eixo x determina a duração da fase *lag* ( $\lambda$ ). O parâmetro  $A$  é a assíntota paralela ao eixo x, calculado como a média dos valores dentro do *plateau* (GOMES; STRANGFELD; MEYER, 2021). Este método é particularmente útil quando a curva apresenta duas fases de produção de metano, comportamento conhecido como diauxia (Figura 3.2), dificultando um bom ajuste dos modelos matemáticos. Neste caso, os parâmetros são estimados para cada fase separadamente.

**Figura 3.2:** Curva de produção de metano com aspecto de diauxia e estimativa gráfica dos parâmetros cinéticos.



Fonte: Gomes *et al.* (2021)

### 3.6 Métodos analíticos

Os métodos descritos a seguir foram empregados na caracterização da biomassa algácea (fresca, densificada e pré-tratada) e do inóculo anaeróbio. Seguiram-se métodos analíticos padrões para determinação de sólidos totais (APHA 2017 - 2540 B), sólidos voláteis (APHA 2017 – 2540E), sólidos suspensos (APHA 2017 - 2540D), demanda química de oxigênio (DQO) total e solúvel (APHA 2017 - 5220) e pH (APHA 2017 - 4500-H<sup>+</sup>) (APHA, 2017). A densidade óptica da biomassa foi medida como forma de verificar o seu crescimento.

#### a) Sólidos Totais

As análises de sólidos totais (ST) foram realizadas em triplicata, de acordo com o método APHA 2017 – 2540B (APHA, 2017). Cadinhos de porcelana limpos e vazios foram levados à mufla (EDG Equipamentos) a 550 °C por 1 h. Em seguida, foram deixados para esfriar em dessecador até atingir a temperatura ambiente e, então, tiveram suas massas (representadas por P<sub>0</sub>) aferidas em balança analítica. Sob agitação magnética, 20 mL de amostra foram transferidos para cada um dos cadinhos. Os cadinhos com amostra foram deixados em estufa (ÉTICA) a 105 °C por aproximadamente 12 h para evaporação da fração líquida da amostra. Passado este tempo, deixou-se que esfriassem em dessecador e, uma vez atingida a temperatura ambiente, a massa final foi aferida e denominada P<sub>1</sub>.

Para determinar os sólidos voláteis (SV), seguiu-se o método APHA 2017 – 2540E. Após determinar a massa  $P_1$ , os cadinhos foram levados à mufla a 550 °C por 30 min. Novamente, deixou-se esfriar em dessecador até a temperatura ambiente e aferiu-se a massa  $P_2$ .

Com  $P_0$ ,  $P_1$  e  $P_2$  calculou-se a concentração de sólidos totais e de sólidos voláteis, de acordo com as equações 3.18 e 3.19, e tomou-se a média das triplicatas como concentração de cada uma das frações de sólidos na amostra.

$$\text{Sólidos Totais} \left[ \frac{mg}{L} \right] = \frac{(P_1 - P_0) \cdot 10^6}{V} \quad (3.18)$$

$$\text{Sólidos Voláteis} \left[ \frac{mg}{L} \right] = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 10^6}{V} \quad (3.19)$$

#### b) Sólidos Suspensos

Os sólidos suspensos totais (SST) foram determinados de acordo com o método APHA 2017 – 2540D (APHA, 2017), com análises realizadas em triplicata. Cadinhos de porcelana limpos e vazios foram levados à mufla (EDG Equipamentos) a 550 °C por 1 h. Filtros de fibra de vidro (Merck Millipore) previamente lavados com água destilada também foram deixados na mufla por 15 min. Em seguida, deixou-se que filtros e cadinhos esfriassem em dessecador. Uma vez atingida a temperatura ambiente, os filtros foram colocados dentro dos cadinhos e as massas de cada conjunto ( $P_0$ ) foram aferidas em balança analítica. Um volume de 20 mL de amostra foi filtrado em filtros de fibra de vidro, e os filtros com o material retido foram transferidos para os cadinhos. Os conjuntos foram levados à estufa (ÉTICA) a 105 °C por aproximadamente 12 h. Passado este tempo, deixou-se esfriar em dessecador e, em seguida, aferiu-se a massa  $P_1$ .

Para determinar os sólidos suspensos voláteis (SSV), seguiu-se o método APHA 2017 – 2540E. Após determinar a massa  $P_1$ , os conjuntos de cadinhos com filtro foram levados à mufla a 550 °C por 30 min. Novamente, deixou-se esfriar em dessecador até temperatura ambiente e, neste ponto, aferiu-se a massa  $P_2$ .

Com  $P_0$ ,  $P_1$  e  $P_2$  calculou-se a concentração de SST, de acordo com a equação 3.18 e SSV com a equação 3.19.

#### c) Demanda química de oxigênio

A análise de demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada de acordo com o método APHA – 2017 5220 (APHA, 2017), em triplicata para as amostras e em

duplicata para o branco. Para as análises de DQO total, 2 mL de amostra foram transferidos para tubos de DQO Hach, e 2 mL de água destilada foram adicionados aos tubos do branco. Para as análises de DQO solúvel, aproximadamente 10 mL de amostra foram filtrados à vácuo em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Em seguida, coletou-se o filtrado e transferiu-se 2 mL para tubos Hach.

Uma vez preenchidos com amostra (ou água destilada, no caso do branco), 1,2 mL de solução digestora (solução ácida de dicromato de potássio,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e reagente  $\text{HgSO}_4$  para eliminar a interferência de cloretos) e 2,8 mL de solução catalítica (catalisador  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) foram adicionados aos tubos, nesta ordem. Em seguida, os tubos foram homogeneizados, tampados e inseridos no bloco digestor (ALFAKIT AT 525) a 150 °C por 2 h. Ao fim deste tempo, retirou-se os tubos e esperou-se que esfriassem no escuro. Por fim, a DQO foi lida em espectrofotômetro Hach DR 3900 escolhendo-se o programa de análise de DQO previamente calibrado com biftalato de potássio.

O método empregado para determinação de DQO é indicado para amostras na faixa de 100 a 1000 mg/L de oxigênio equivalente (mg  $\text{O}_2$ /L), e admite uma concentração máxima de cloreto de 2000 mg/L. Amostras com concentrações de cloreto ou de matéria orgânica superiores a estes limites foram diluídas antes da análise e o resultado da leitura foi multiplicado pelo fator de diluição.

#### d) pH

Utilizou-se o pHmetro digital microprocessado (QUIMIS) para medição de pH. O eletrodo de pH foi previamente calibrado à temperatura ambiente utilizando-se soluções-padrão de pH 4,01, 6,86 e 9,18.

#### e) Densidade óptica

A densidade óptica ( $D.O._{750\text{nm}}$ ) das amostras foi medida a 750 nm em tubos de vidro com 13 mm de caminho óptico em espectrofotômetro Hach DR3900. As medições foram feitas em duplicata utilizando aproximadamente 4 mL de amostra, e água destilada foi utilizada como branco antes de cada medição.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise comparativa entre os métodos de pré-tratamento químico e termoquímico

#### 4.1.1 Métodos de pré-tratamento selecionados

Os métodos avaliados na análise comparativa, bem como seus resultados, são os mesmo descritos na Tabela 2.6. De acordo com os critérios adotados, a triagem dos dados da literatura resultou em 28 condições de pré-tratamento químico e termoquímico da biomassa algácea voltados para a produção de metano, sendo metade deles termoquímico com hidróxido de sódio. O pré-tratamento utilizando álcalis como reagente é o mais empregado nos estudos com biomassa algácea, provavelmente por ser um método bastante usual no pré-tratamento de lodo ativado residual e resíduos sólidos orgânicos urbanos (KIM *et al.*, 2003). Por outro lado, o pré-tratamento ácido destaca-se quando o objetivo é a produção de etanol, sendo pouco explorado para aumentar a produção de metano. Assim, mais estudos se fazem necessários para uma melhor avaliação de seus efeitos sobre a digestão anaeróbia.

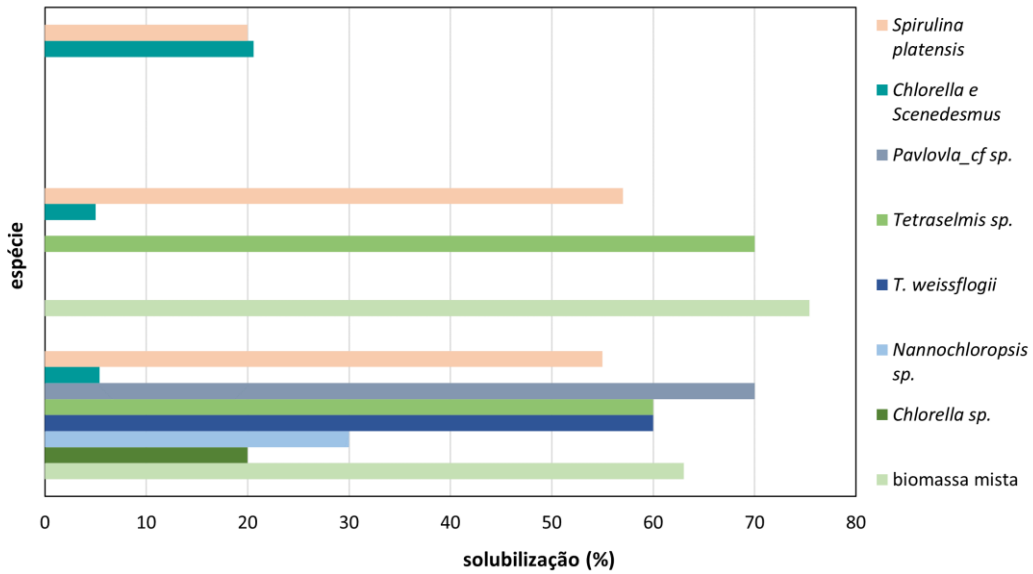
Os pré-tratamentos selecionados foram realizados à temperatura ambiente (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; CHO *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2020; SPOSOB *et al.*, 2020), sob temperaturas moderadas,  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (MAHDY *et al.*, 2014a; PASSOS *et al.*, 2016; SAMSON; LEDUY, 1983), ou  $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999; RINCÓN-PÉREZ *et al.*, 2019; SAMSON; LEDUY, 1983). No primeiro caso, o tempo de exposição da biomassa é maior, enquanto o segundo tem duração mais curta, geralmente uma hora ou menos. Notou-se que o rendimento em metano variou de acordo com a espécie usada, sendo as espécies *Spirulina maxima*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp. as mais investigadas.

Nas Figuras 4.1 e 4.2 são apresentados resultados de solubilização para os pré-tratamentos com NaOH e HCl selecionados. Nos trabalhos revisados, os pré-tratamentos conduzidos à temperatura ambiente e em pH alcalino (Fig. 4.1a) resultaram em maiores solubilizações (de até 70%) do que em pH ácido (Fig. 4.2a), com solubilizações abaixo de 25%. O emprego de temperaturas acima de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  no pré-tratamento termoquímico aumentou a solubilização, tanto com ácido clorídrico (Fig. 4.2b) como com hidróxido de sódio (Fig. 4.1b). No tratamento termoquímico com NaOH, a máxima solubilização foi observada no trabalho de Bohustky *et al.*(2014),

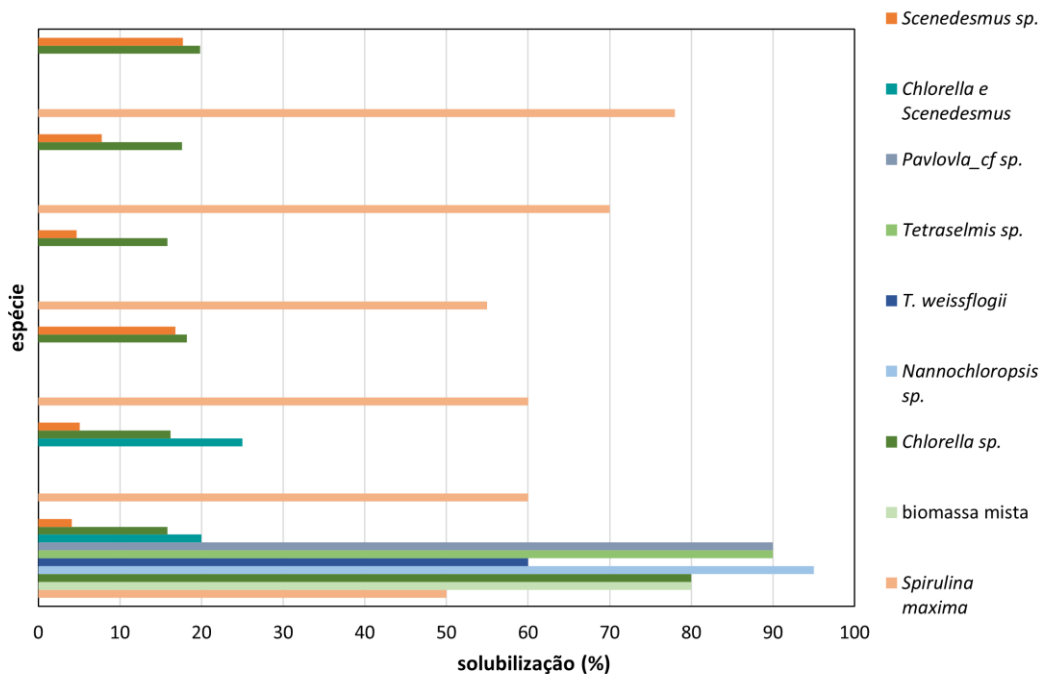


chegando a 95% de solubilização da biomassa de *Nannochloropsis* sp. empregando-se 20 g/L de NaOH a 120 °C por 30 minutos (Fig. 4.1b).

**Figura 4.1:** Solubilização da biomassa de diferentes microalgas após pré-tratamento com NaOH (de acordo com valores reportados na literatura). (a) pré-tratamento à temperatura ambiente. (b) pré-tratamento termoquímico.



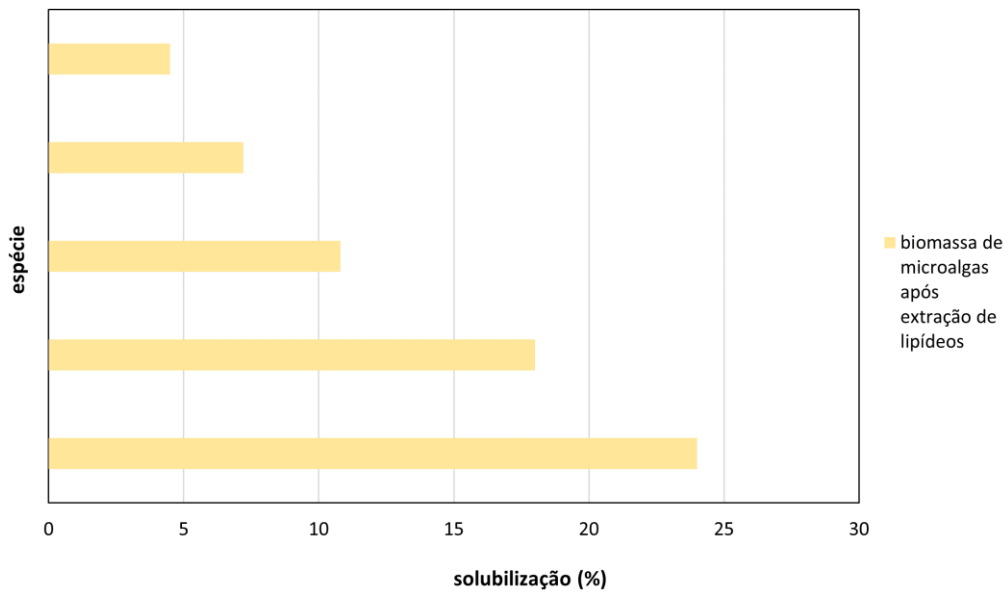
(a)



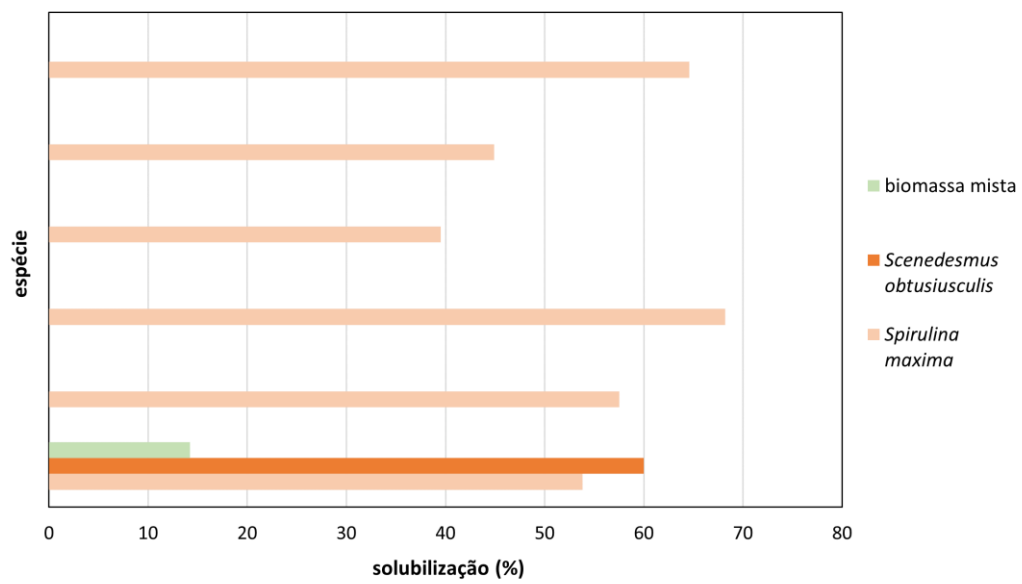
(b)

Fonte: elaboração própria (2021)

**Figura 4.2:** Solubilização da biomassa de diferentes microalgas após pré-tratamento com HCl (de acordo com valores reportados na literatura). (a) pré-tratamento à temperatura ambiente. (b) pré-tratamento termoquímico.



(a)



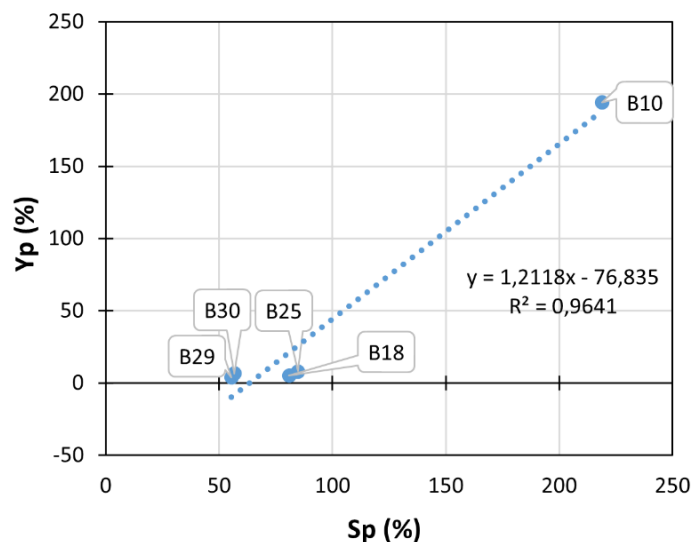
(b)

Fonte: elaboração própria (2021)

#### 4.1.2 Relação entre solubilização da biomassa e rendimento em metano após pré-tratamento

Dos pré-tratamentos com NaOH à temperatura ambiente apresentados na Tabela 2.6, oito (B10, B11, B18, B25, B26, B27, B29 e B30) atenderam aos critérios de seleção (variação na solubilização  $\geq 50\%$  e variação positiva no rendimento em metano) e apenas cinco (B10, B18, B25, B29 e B30) mostraram uma correlação positiva entre a solubilização e o rendimento em metano ( $R^2 = 0,9641$ , Fig. 4.3). Contudo, à exceção de B10, os maiores aumentos de rendimento se encontraram abaixo de 10%, indicando que o pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente tem pouca influência sobre o rendimento final da digestão anaeróbia. Provavelmente, devido ao emprego de altas concentrações de álcalis para elevar o pH, levando a concentrações também elevadas de  $\text{Na}^+$  e à inibição dos microrganismos metanogênicos (KIM; LEE, 2013; PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999). É comum o emprego de concentrações de NaOH de até 20 g/L, sobretudo quando se deseja alcançar  $\text{pH} \geq 12$  (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014; PENAUD; DELGENÈS; MOLETTA, 1999), o que torna o pré-tratamento com NaOH desvantajoso para o processo de digestão da biomassa algácea visando à produção de energia.

**Figura 4.3:** Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano alcançados após pré-tratamento químico com álcalis em temperatura ambiente – vários autores

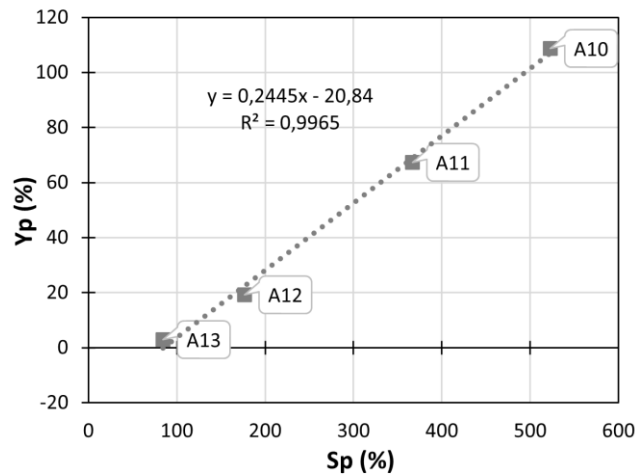


Fonte: elaboração própria (2021).

Sposob *et al.* (2020) observaram uma relação direta entre a solubilização e o rendimento em metano quando aplicado o pré-tratamento químico com HCl (Fig. 4.4).

No entanto, não é possível afirmar que a correlação apontada neste único estudo é válida para outras espécies e condições.

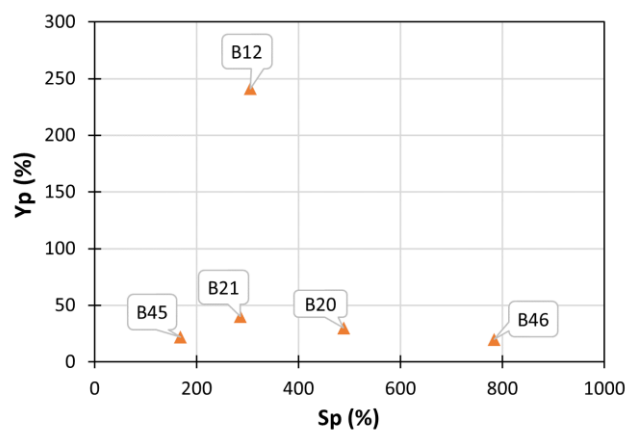
**Figura 4.4:** Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano após pré-tratamento químico com HCl em temperatura ambiente – Sposob et al. (2020)



Fonte: elaboração própria (2021).

Quase todos os pré-tratamentos termoquímicos com álcalis incluídos na Tabela 2.6 obtiveram variação na solubilização  $\geq 50\%$ . No entanto, apenas oito deles (B4 a B6, B12, B20, B21, B45, B46) resultaram em variação positiva no rendimento em metano. Na Figura 4.5 observa-se que não há correlação ( $R^2 = 0,0042$ ) entre a solubilização promovida por este método de pré-tratamento e o rendimento em metano.

**Figura 4.5:** Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano alcançados após pré-tratamento termoquímico com NaOH – vários autores

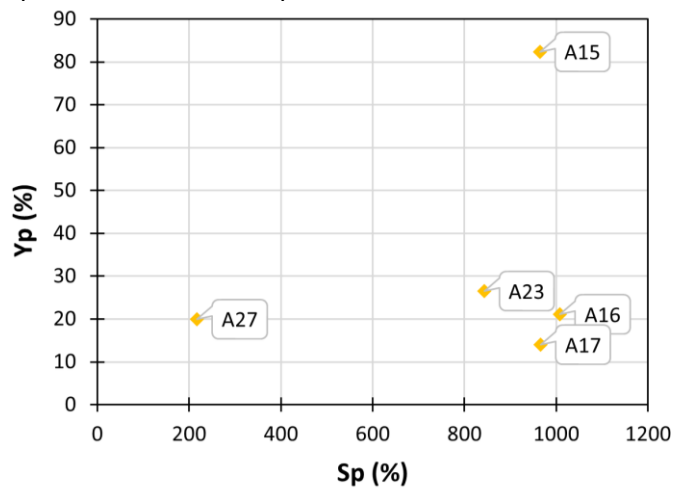


Fonte: elaboração própria (2021)

A maioria dos pré-tratamentos termoquímicos com HCl apresentados na Tabela 2.6 obteve solubilização acima de 50%. Entretanto, somente cinco levaram a

aumentos superiores a 20% no rendimento em metano (A15-A17, A23 e A27). Não se verifica uma correlação entre o aumento na solubilização e o aumento no rendimento em metano ( $R^2 = 0,0689$ , Fig. 4.6). A degradação dos carboidratos por ácido concentrado pode produzir compostos como 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, ambos inibitórios no metabolismo de microrganismos anaeróbios, o que pode prejudicar a geração de metano (AMIN *et al.*, 2017; GHASIMI *et al.*, 2016).

**Figura 4.6:** Correlação entre solubilização da biomassa de microalgas e rendimento em metano após pré-tratamento termoquímico com HCl – vários autores.



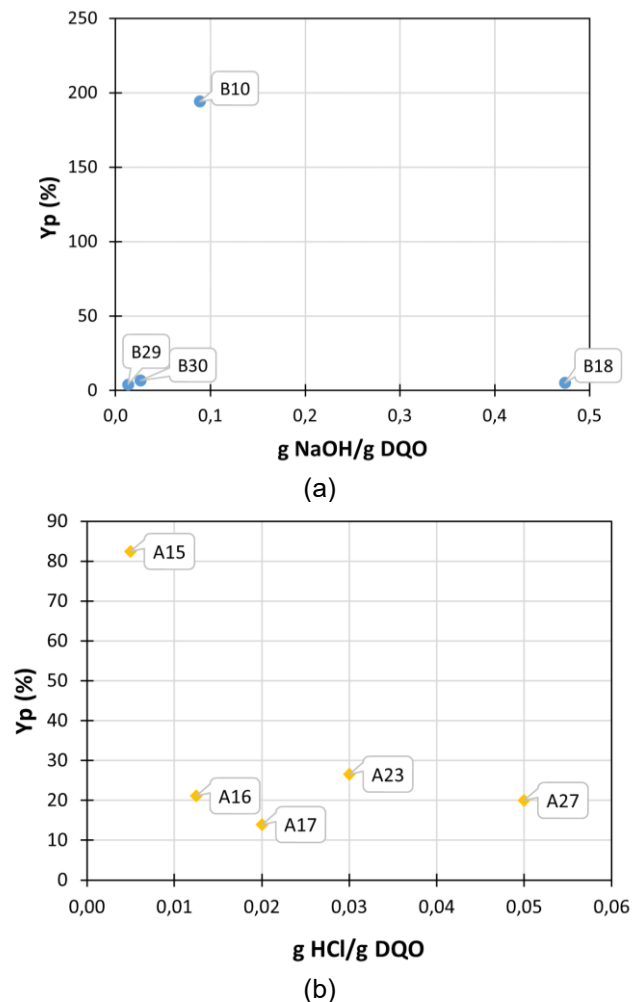
Fonte: elaboração própria (2021).

De fato, a relação entre solubilização e rendimento em metano não está bem definida, sendo observado que condições que levam à alta solubilização de matéria orgânica não necessariamente são as mesmas que levam ao maior rendimento em metano na digestão anaeróbia. Isto por que a solubilização da matéria-prima não implica, diretamente, na disponibilização dos substratos. Assim, a natureza das moléculas solubilizadas pelo pré-tratamento possui um importante papel para a produção de metano. Contudo, os pré-tratamentos químico e termoquímico não são seletivos: tanto a temperatura como os reagentes são capazes de degradar uma variedade de componentes da biomassa, como carboidratos e proteínas, e não há como controlar quais e quantas moléculas se formarão neste processo, podendo haver a geração de compostos inibidores e recalcitrantes. O emprego de métodos analíticos após o pré-tratamento permitiria identificar e quantificar as moléculas solubilizadas, contribuindo com mais informações para avaliar as condições experimentais escolhidas. Assim, seria possível otimizar o pré-tratamento não apenas em termos de solubilização, mas também buscando minimizar a formação de componentes recalcitrantes que não serão usados pelos microrganismos.

### 4.1.3 Influência das condições de pré-tratamento químico e termoquímico sobre o rendimento em metano da biomassa algácea

Apesar dos dados apresentados na Figura 4.7 não mostrarem uma correlação significativa, pode-se verificar um efeito negativo da concentração do reagente (em massa de reagente por massa de biomassa) sobre o rendimento em metano no pré-tratamento químico com álcalis à temperatura ambiente (Fig. 4.7a) e no pré-tratamento termoquímico com HCl (Fig. 4.7b), sugerindo que o emprego de ácido diluído seria menos prejudicial para a produção de metano.

**Figura 4.7:** Efeito da concentração de reagente sobre o rendimento em metano no pré-tratamento químico com NaOH à temperatura ambiente (a) e no pré-tratamento termoquímico com HCl (b) – vários autores.



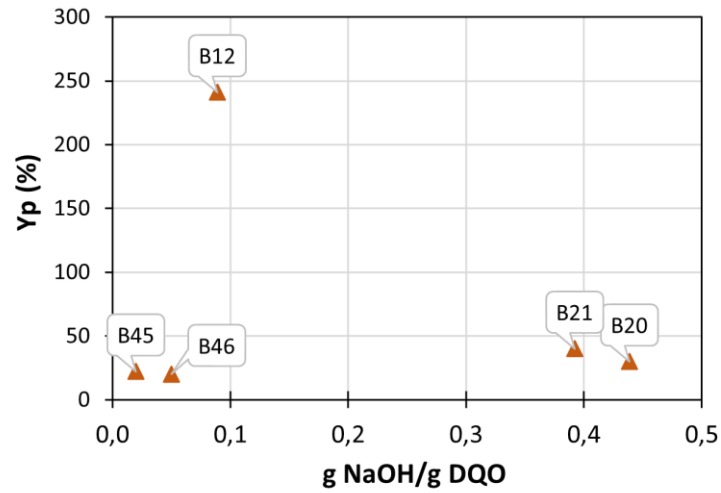
Fonte: elaboração própria (2021)

No pré-tratamento termoquímico com NaOH, há um efeito negativo da massa de NaOH por massa de biomassa (em DQO) (Fig. 4.8a) sobre o rendimento em metano. A temperatura, no entanto, apresenta um efeito positivo sobre o rendimento em metano no pré-tratamento termoquímico com NaOH (Fig. 4.8b). A temperatura é

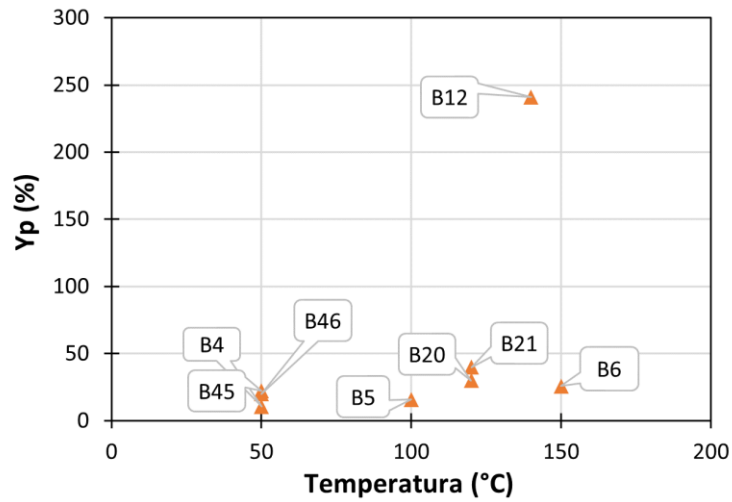
capaz de romper ligações de hidrogênio entre as moléculas, desnaturar proteínas e despolimerizar carboidratos. Quando em comparação com outros métodos de pré-tratamento, o térmico tem se mostrado bastante eficiente na digestão anaeróbia, levando a rendimentos em metano comparáveis ou mesmo superiores ao da biomassa pré-tratada por métodos químicos e físicos (CHO *et al.*, 2013).

O tempo, ao contrário da temperatura, tem um efeito negativo sobre o rendimento em metano (Fig. 4.8c), provavelmente devido à formação de componentes recalcitrantes em tratamentos mais prolongados.

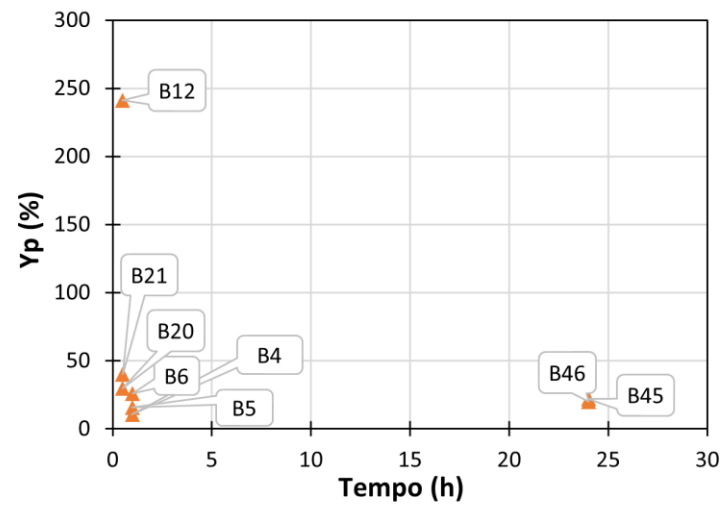
**Figura 4.8:** Efeito da concentração de reagente (a), temperatura (b) e tempo (c), no pré-tratamento termoquímico com NaOH, sobre o rendimento em metano – vários autores.



(a)



(b)



(c)

Fonte: elaboração própria (2021)

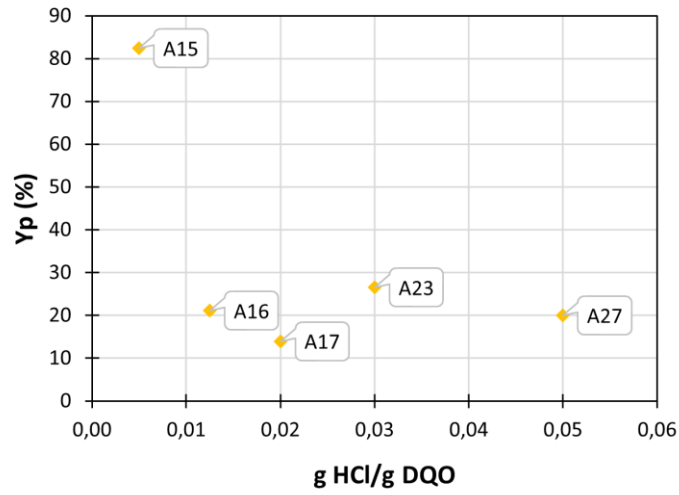


No pré-tratamento termoquímico usando ácido, tanto a concentração de reagente (Fig. 4.9a) como a temperatura (Fig. 4.9b) têm efeito negativo no rendimento em metano da biomassa pré-tratada (Fig. 4.9a), sugerindo que o emprego de ácido diluído e temperaturas mais amenas seria menos prejudicial para a produção de metano. Por outro lado, o tempo exerce um efeito positivo no pré-tratamento termoquímico com HCl (Fig. 4.9c). É possível dizer, portanto, que menor temperatura e maior tempo favorecem o rendimento. Essa parece ser a estratégia adotada no pré-tratamento conduzido por Passos *et al.* (2016). Este estudo (A15) ilustra bem as melhores condições para este método: reagente diluído (0.5% m/m,) maior tempo de reação (2 h) e temperatura mais amena (80 °C) resultaram em um rendimento em metano, da biomassa pré-tratada, 82% maior que o da biomassa bruta.

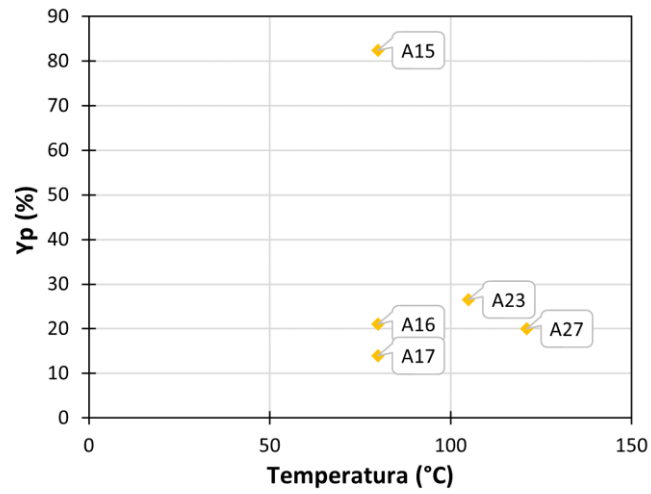
O conjunto de dados analisado confirma a tendência encontrada na literatura sobre a falta de correlação entre solubilização da biomassa algácea e produção de metano. No caso dos pré-tratamentos químicos e termoquímicos, isto representa a necessidade de seguir explorando alternativas de reagentes e condições experimentais, haja vista o caso do pré-tratamento com álcalis, tradicional para outras biomassas, mas que produz pouco efeito sobre a biomassa algácea.

Por outro lado, associar as condições do pré-tratamento diretamente ao rendimento em metano prioriza os melhores resultados da digestão anaeróbia, auxiliando na escolha de métodos que de fato beneficiem a produção de energia ao invés de focar em maximizar a solubilização. Além disso, a diferença na composição química da biomassa faz com que certas condições de pré-tratamento sejam eficazes com uma espécie e indiferentes para outra. Logo, a identificação e escolha de espécies mais susceptíveis ao pré-tratamento também pode ser uma forma de otimizar a produção de metano.

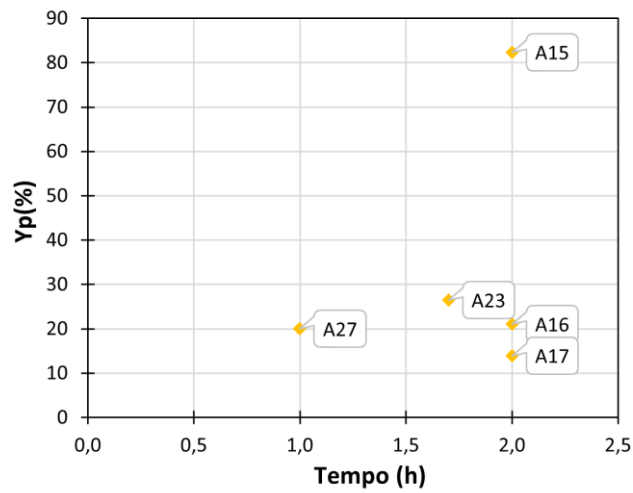
**Figura 4.9:** Efeito da concentração de reagente (a), temperatura (b) e duração (c), do pré-tratamento termoquímico com HCl, sobre o rendimento em metano.



(a)



(b)



(c)

Fonte: elaboração própria (2021).

#### 4.1.4 Severidade do pré-tratamento termoquímico

A Tabela 4.1 mostra a severidade de cada pré-tratamento analisado. Do conjunto de dados explorado, dois pré-tratamentos ácidos (A4 e A7) e três alcalinos (B12, B4 e B5) apresentaram log CS menor que zero, o que não é comum. Os três pré-tratamentos alcalinos empregaram pH semelhante, os mais baixos dentre os métodos termoalcalinos avaliados. Além disso, B4 empregou uma temperatura moderada, e a curta duração de B12 fez com que estes três apresentassem um fator de severidade combinada menor que zero, sendo classificados como não-severos. De maneira semelhante, as condições A4 e A5 foram realizadas em temperatura baixa (50 °C), o que explica o log CS menor que zero.

Tabela 4.1: Severidade dos pré-tratamentos termoquímicos.

Pré-tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	pH	R <sub>0</sub>	log R <sub>0</sub>	log CS
B4	50	60	11	2,02	0,31	-2,69
B5	100	60	11	60	1,78	-1,22
B6	150	60	11	1779,66	3,25	0,25
B12	140	30	10	451,72	2,65	-1,35
B20	120	30	13	116,41	2,07	1,07
B21	120	30	14	116,41	2,07	2,07
B24	120	30	13	116,41	2,07	1,07
A4	50	60	1	2,02	0,31	-0,69
A7	50	60	3	2,02	0,31	-2,69
A8	150	60	3	1779,66	3,25	0,25
A15	80	120	1	30,92	1,49	0,49
A16	80	120	0,6	30,92	1,49	0,89
A17	80	120	0,4	30,92	1,49	1,09
A23	105	102	1,1	143,16	2,16	1,06
A27	121	60	0,3	249,15	2,4	2,1

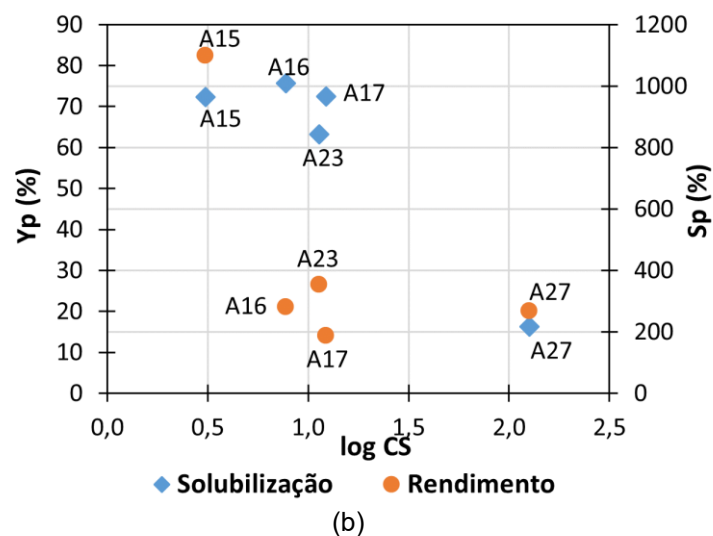
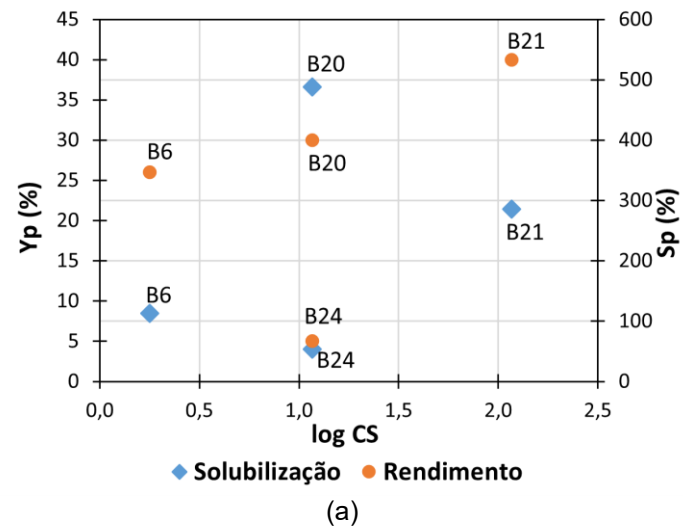
Fonte: elaboração própria (2021)

Com relação ao pré-tratamento termoquímico com NaOH, a análise da severidade indica que as maiores solubilizações e rendimentos em metano encontram-se na região de maior severidade (Fig. 4.10a), exceto por uma condição (B24), na qual o pré-tratamento não fez diferença na digestão de *Pavlova\_cp*, uma

espécie de parede celular de fácil degradação (BOHUTSKYI; BETENBAUGH; BOUWER, 2014). No pré-tratamento ácido, as maiores solubilizações se encontram na região de severidade entre 0,5 e 1,5, enquanto o maior aumento no rendimento se deu na menor severidade (Fig. 4.10b).

De acordo com Ferreira *et al.* (2013), quanto mais severo o pré-tratamento, mais os polissacarídeos da biomassa são degradados, aumentando a disponibilidade de matéria orgânica para a digestão. Entretanto, condições extremas podem levar à formação de compostos inibitórios, tornando os pré-tratamentos mais severos ineficazes do ponto de vista da produção de metano (FERREIRA *et al.*, 2013).

**Figura 4.10:** Severidade dos pré-tratamentos termoquímicos. (a) com NaOH, (b) com HCl.



Fonte: elaboração própria (2021).

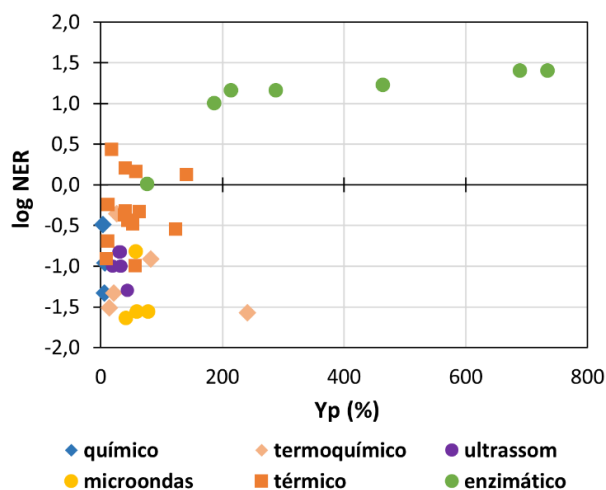
Em resumo, a partir das análises realizadas, verificou-se que utilizar reagente diluído é mais indicado para o pré-tratamento químico com álcalis e para o

termoquímico com ácido, enquanto que tempo e temperatura possuem efeitos compensatórios no pré-tratamento termoquímico, independente do reagente utilizado. Com base nestas conclusões, escolheu-se como condições experimentais para o pré-tratamento termoquímico da biomassa de cianobactérias o pré-tratamento termoquímico com ácido diluído (0,1% a 1,0%), temperaturas entre 50 °C e 100 °C e duração entre 1h e 4h, resultando em condições menos severas.

#### 4.1.5 Avaliação energética

O gráfico da Figura 4.11 apresenta o balanço energético de diversos métodos de pré-tratamento da biomassa algácea para digestão anaeróbia, tendo em conta o aumento percentual na produção de metano ( $Y_p$ ). Para ser considerada economicamente viável, a razão  $E_{out}/E_{in}$  (também chamada *NER – net energy ratio*) do processo deve ser maior que 1,0, significando que a energia produzida é capaz de suprir a energia requerida pelo processo. Quando a razão é menor que 1,0, a energia precisa ser suplementada por outras fontes (preferencialmente renováveis), o que implica em um investimento a mais no processo, tornando-o menos atrativo. Para  $\log \text{NER} > 0$ , o balanço energético é positivo (produz mais energia do que consome);  $\log \text{NER} = 0$  significa que o balanço energético é neutro (produz igual ao que consome), e  $\log \text{NER} < 0$  indica balanço energético negativo (consome mais do que produz).

**Figura 4.11:** NER (net energy ratio) de diversos métodos de pré-tratamento da biomassa algácea visando aumento na produção de metano ( $Y_p$ )



Apenas os pré-tratamentos enzimáticos e quatro condições de pré-tratamento térmico apresentaram  $\log \text{NER} > 0$ . O pré-tratamento biológico é frequentemente citado como menos intensivo em energia, visto que não necessita de altas

temperaturas e equipamentos com alto consumo elétrico. Nos trabalhos de Ometto *et al.* (2014a) (E1 a E6) e de Çakmak e Ugurlu (2020) (E7), este método apresentou um balanço energético favorável em decorrência de aumentos expressivos no rendimento em metano após o pré-tratamento enzimático. No entanto, o alto custo das enzimas comerciais ainda torna proibitiva a implementação deste método em larga escala (MARQUES *et al.*, 2018). De acordo com a avaliação econômica de Çakmak e Ugurlu (2020), o custo das enzimas deve estar entre 0,18 e 0,28 €/L para que o processo seja economicamente viável nas condições estudadas por eles.

Balanço energético positivo foi obtido para o pré-tratamento térmico da biomassa de *Chlorella sorokiniana*. A condição mais eficiente para geração de metano (80°C, 30 minutos) alcançou NER de 2,7. Outros métodos físicos (ultrassom, hidrotérmico, explosão à vapor) foram examinados no mesmo estudo (CÓRDOVA; PASSOS; CHAMY, 2018) e, apesar de levarem a rendimentos em metano maiores que o pré-tratamento térmico, a demanda energética foi muito elevada para justificar sua utilização. Em segundo lugar, destaca-se o pré-tratamento térmico de *Scenedesmus* sp. a 65 °C por 4 h (SCARCELLI *et al.*, 2020). Ometto *et al.* (2014) também obtiveram balanço energético positivo para o pré-tratamento hidrotérmico de *Scenedesmus obliquus* (165 °C, 30 min).

No entanto, Passos *et al.* (2013) demonstraram que mesmo pré-tratamentos em temperaturas inferiores a 100 °C não alcançam um balanço energético positivo se a concentração da biomassa for inferior a 2% ST, ressaltando a importância de uma etapa de concentração da biomassa anterior ao pré-tratamento. Recentemente, para contornar a demanda energética do pré-tratamento térmico, alguns autores têm investigado sistemas que utilizam energia solar no aquecimento da biomassa. Xiao *et al.* (2019) propuseram um sistema baseado em energia solar para o pré-tratamento hidrotérmico (155 °C, 30 min) da biomassa de *Chlorella pyrenoidosa*. A energia gerada na digestão anaeróbia foi 3,64 vezes superior à demanda energética da etapa de pré-tratamento e o rendimento energético de todo o processo alcançou NER de 1,45. Similarmente, Vassalle *et al.* (2022) obtiveram NER aproximadamente 2,0 na co-digestão de lodo primário com biomassa algácea pré-tratada termicamente em um dispositivo utilizando energia solar.

Os pré-tratamentos mecânicos são pouco atrativos devido ao grande consumo energético dos equipamentos. No trabalho de Passos *et al.* (2014), apenas

quando a biomassa foi concentrada em uma etapa anterior obteve-se balanço energético neutro para o pré-tratamento com ultrassom.

Diversos estudos abordam o efeito dos pré-tratamentos químico e termoquímico na digestão anaeróbia da biomassa algácea; entretanto, poucos trazem a avaliação energética destes métodos. Candia-Lomeli *et al.* (2022) investigaram quatro métodos de pré-tratamento alcalino de *Scenedesmus obtusiusculus*. Apesar da melhor solubilização ter ocorrido com 15% CaO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5% (v/v), os autores avaliaram a digestão anaeróbia com a biomassa tratada em condições mais brandas como forma de diminuir a demanda energética e os custos do processo. Dentre estas condições, os maiores rendimentos em metano foram obtidos com NaOH 4 M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5%, representando aumentos de 47% e 34%, respectivamente, na produção de energia, em comparação com a biomassa não tratada. Além disso, a energia extra gerada pelo pré-tratamento com NaOH proporcionou uma redução de 14,3% nos custos do processo. Ressalta-se que, no estudo citado, a digestão anaeróbia foi realizada em condições alcalinas (pH 9) com inóculo previamente aclimatado, eliminando a necessidade de adição de reagentes para correção do pH após o pré-tratamento. Alterações bruscas no pH podem causar desequilíbrio na comunidade microbiana e prejudicar a produção de metano.

Dentre todas as condições de pré-tratamentos químico e termoquímicos selecionadas para a análise comparativa, apenas oito continham informações suficientes para determinar seu balanço energético. Nenhum dos pré-tratamentos químicos e termoquímicos avaliados apresentou NER > 1,0. Os pré-tratamentos químicos com álcalis, apesar de realizados à temperatura ambiente, por vezes requerem condições severas de pH para maximizar a solubilização da biomassa (CHO *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2020), podendo causar inibição aos microrganismos metanogênicos devido ao acúmulo de Na<sup>+</sup>. Assim, o incremento no rendimento em metano após o pré-tratamento alcalino é muito baixo (CHO *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2020) e a energia produzida não é suficiente para compensar a demanda energética. Os pré-tratamentos termoquímicos analisados neste trabalho foram mais eficazes em aumentar o rendimento em metano da digestão anaeróbia do que os métodos químicos. Porém, nenhuma das condições analisadas chegou a um balanço energético positivo. Esta conclusão está de acordo com Marques *et al.* (2018) que, ao analisar 24 pré-tratamentos, concluíram que o pré-tratamento alcalino é o menos

eficiente para a digestão anaeróbia da biomassa algácea e que o pré-tratamento termoquímico não é eficiente do ponto de vista energético.

A digestão anaeróbia da biomassa algácea é proposta não como um processo isolado, mas integrado dentro de biorrefinarias e estações de tratamento de efluentes. O pré-tratamento, quando avaliado dentro deste contexto pode se tornar viável com a otimização dos demais processos envolvidos. Ometto *et al.* (2014) avaliaram seis cenários distintos para uma estação de tratamento de efluentes de larga escala que emprega microalgas no tratamento terciário para remoção de nitrogênio e fósforo. O sistema completo é composto por uma unidade de lodo ativado, uma lagoa de polimento, uma unidade de flotação para concentrar a biomassa de microalgas, uma unidade de pré-tratamento hidrotérmico (apenas para a biomassa algácea) e o reator anaeróbio. No cenário em que a unidade de flotação convencional foi substituída por uma mais eficiente, a energia produzida pela codigestão da biomassa algácea com o lodo ativado correspondeu a 76% da demanda energética de todo o processo. Isto representa um aumento de quase duas vezes em comparação ao cenário em que o pré-tratamento não foi realizado, e de 1,33 vezes com relação ao cenário que considerou uma unidade de flotação com ar diluído (OMETTO; WHITTON; *et al.*, 2014).

Passos *et al.* (2017) avaliaram o balanço energético para um ano de operação de uma estação de tratamento de efluentes com capacidade de 1500 m<sup>3</sup>/d. Em estudo preliminar, os mesmos autores determinaram que o pré-tratamento térmico a 75 °C por 10 horas foi o mais eficiente, levando a um aumento de 44% no rendimento em metano da codigestão da biomassa algácea com lodo ativado. No cenário em que todo o biogás produzido foi utilizado para cogeração de energia térmica e eletricidade, o pré-tratamento da biomassa algácea contribuiu para que a estação fosse autossuficiente durante todo o ano, enquanto que na ausência de pré-tratamento, energia térmica proveniente de outras fontes deveria ser fornecida à estação de tratamento nos meses de inverno (PASSOS *et al.*, 2017).

#### **4.2 Cultivo da biomassa de *S. subsalsus***

Os cultivos de *S. Subsalsus* foram mantidos em *shakers* por 30 dias a 23 °C e 150 rpm. Após este período, a suspensão das cianobactérias foi caracterizada em termos de D.O.<sub>750 nm</sub>, SST, DQO total e DQO solúvel (Tabela 4.2). Todos os cultivos foram preparados com a mesma concentração inicial de células (D.O.<sub>750nm</sub> = 0,06) e



em meio BG-11. No entanto, intercorrências durante o período de crescimento resultaram em cultivos com características finais diferentes. Em alguns casos, notou-se a presença de material extracelular alaranjado na superfície dos cultivos e alterações na coloração do verde escuro natural para um tom de verde mais claro. Estas mudanças se devem a flutuações na temperatura dos *shakers* e eventuais alterações no ciclo de iluminação. Por causa dessas interferências, alguns cultivos ficaram menos concentrados que outros, de forma que a concentração final variou entre 0,36 e 0,6 g SST/L. Oliveira (2019) obteve cultivos de *S. Subsalsus* com concentração de 0,398 g/L de biomassa após 20 dias de crescimento nas mesmas condições, e aproximadamente 1 g/L com 61 dias. No presente estudo, nenhuma contaminação por microrganismos externos foi observada durante ou ao final do crescimento da biomassa de *S. Subsalsus*, e suas características finais mantiveram-se preservadas por, aproximadamente, 15 dias quando armazenados sob refrigeração (4 °C).

**Tabela 4.2:** Caracterização dos cultivos de *S. subsalsus*

<b>Cultivo</b>	<b>DQO<sub>T</sub></b> <b>(mg O<sub>2</sub>/L)</b>	<b>DQO<sub>s</sub></b> <b>(mg O<sub>2</sub>/L)</b>	<b>D.O.<sub>750 nm</sub></b>	<b>SST (mg/L)</b>
Cultivo 1	457	62	0,457	364,7
Cultivo 2	439	91	0,511	409,5
Cultivo 3	591	170	0,454	362,3
Cultivo 4	477	260	0,551	442,6
Cultivo 5	862	271	0,605	487,4
Cultivo 6	906	300	0,633	510,6
Cultivo 7	442	43	0,567	455,9
Cultivo 8	540	75	0,747	605,1
Cultivo 9	554	135	0,642	518,1
Média ± DP	585 ± 178	156 ± 99	0,574 ± 0,095	461,8 ± 78,4

Fonte: elaboração própria (2022)

Os cultivos 1 a 5 foram utilizados nos experimentos do Planejamento 1, o cultivo 6 no Planejamento 2, o cultivo 7 no ensaio de digestão anaeróbia da biomassa fresca, o cultivo 8 na digestão da biomassa densificada e o cultivo 9 na digestão da biomassa densificada e hidrolisada.

### 4.3 Densificação da biomassa de *S. subsalsus* por coagulação/floculação com quitosana

A biomassa dos cultivos 2, 4, 5, 6, 8 e 9 foi submetida à coagulação/floculação utilizando 0,3 g quitosana/g SST, pH 7,0, TMR de 100 rpm/1 min, TML = 40 rpm/15 min e TS = 45 min. O pH inicial dos cultivos variou de 8,3 a 9,0. Como a quitosana foi preparada em solução de ácido acético, atingiu-se um pH neutro após a adição da quitosana e não foi necessário ajustar o pH da biomassa para realizar a coagulação/floculação.

O teste *t-Student* mostrou que não houve diferença significativa para a eficiência de floculação ( $p\text{-value} = 0,11$ ) e para o fator de concentração ( $p\text{-value} = 0,10$ ) obtidos com ambas as quitosanas empregadas nos ensaios (Sigma-Aldrich e Polymar), o que indica que o floculante de qualidade industrial (Polymar) está apto para ser usado neste processo.

Apesar da concentração inicial de biomassa ser diferente em cada cultivo, a eficiência de floculação foi semelhante, mantendo-se acima de 80%. Obteve-se uma eficiência de floculação média de  $89,9 \pm 6,7\%$  e um fator de concentração de  $27,5 \pm 1,5$ . Resultados similares foram reportados por Zhu *et al.* (2018): adotando TMR = 150 rpm/1 min, TML = 25 rpm/15 min e TS = 15 min, obteve-se eficiências de floculação de 96,3% e 91,9% usando uma relação de 0,5 e 0,21 g de quitosana/g SST, respectivamente, na coagulação/floculação de *Chlorella vulgaris*. Lama *et al.* (2016) obtiveram fator de concentração de  $24,0 \pm 0,9$  com 0,15 g de quitosana/g biomassa (TMR = 350 rpm/10 min; TML = 250 rpm/20 min e TS = 30 min) para a microalga *Chlorella vulgaris*, e máxima eficiência de floculação de 97%.

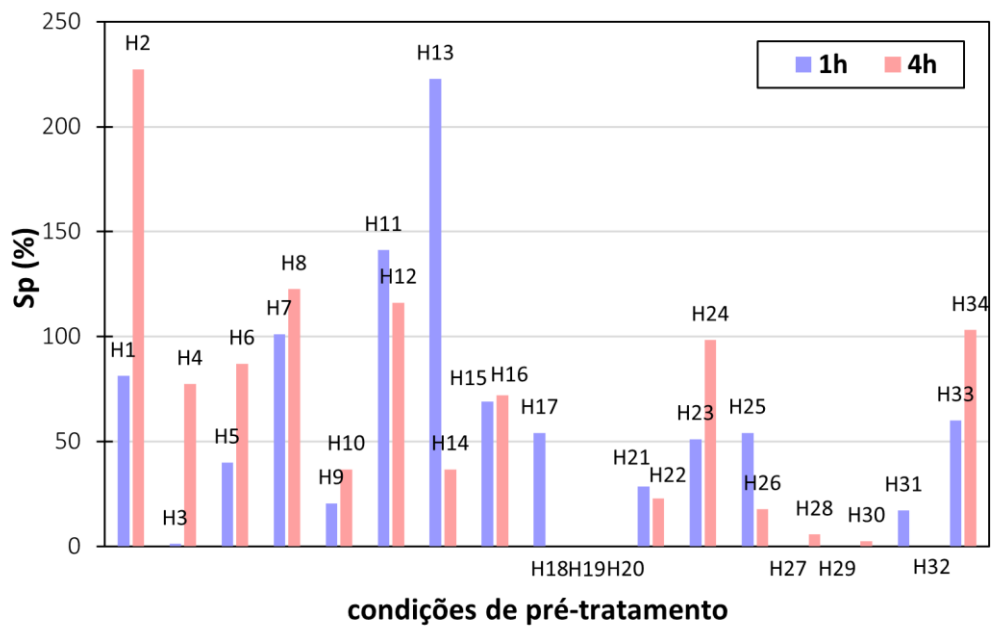
### 4.4 Pré-tratamento termoquímico com ácido da biomassa de *S. subsalsus*

#### 4.4.1 Planejamento 1

O primeiro planejamento experimental resultou em 34 condições de pré-tratamento termoquímico com ácido clorídrico. Os resultados de solubilização final ( $S$ ) e o aumento percentual na solubilização ( $S_p$ ) alcançados após o pré-tratamento são mostrados na Tabela 4.3. Tanto nos experimentos com 1 h e com 4 h de duração, a maioria dos pré-tratamentos levou a um grau de solubilização final entre 30 e 75%, e apenas H13 alcançou 100%. As condições experimentais H7, H11 e H13, com 1 h de duração, e H2, H8, H12 e H34, com 4 h, produziram um aumento na solubilização da biomassa ( $S_p$ ) superior a 100%. Não obstante, comparando os pré-tratamentos

realizados por 1 h com as condições correspondentes aplicadas durante 4 h, nota-se que nem sempre maior duração proporcionou melhores resultados (Fig. 4.12). Isto fica claro ao observar que os pré-tratamentos com 1 h de duração que levaram aos maiores  $S_p$  (H7, H11 e H13) não melhoraram o desempenho quando realizados por 4 h (H8, H12 e H14).

**Figura 4.12:** Aumento na solubilização da biomassa de cianobactérias após pré-tratamentos termoquímicos com HCl (Planejamento 1)



Fonte: Elaboração própria (2022)

**Tabela 4.3:** Resultados dos experimentos de pré-tratamento termoquímico do Planejamento 1

Experimento	Condições dos pré-tratamentos			S (%)	S <sub>p</sub> (%)
	T (°C)	Conc. HCl (% v/v)	Conc. biomassa (mg SST/100 mL)		
H1	100	1,0	10,9	52	81,2
H3	50	0,1	10,9	29	1,2
H5	50	1,0	10,9	40	40,0
H7	100	0,1	10,9	58	101,2
H9	50	1,0	18,1	37	20,6
H11	100	0,1	18,1	75	141,2
H13	100	1,0	18,1	100	222,8
H15	50	0,1	18,1	52	69,1
H17	75	1,3	14,5	70	54,1
H19	33	0,55	14,5	24	0,0
H21	75	0,0	14,5	47	28,7
H23	117	0,55	14,5	56	51,2
H25	75	0,55	7,3	57	54,2
H27	75	0,55	21,7	26	0,0
H29 (C)	75	0,55	14,5	35	0,0
H31 (C)	75	0,55	14,5	43	17,2
H33 (C)	75	0,55	14,5	40	60,1
H2	100	1,0	10,9	65	277,4
H4	50	0,1	10,9	31	77,4
H6	50	1,0	10,9	32	87,1
H8	100	0,1	10,9	38	122,6
H10	50	1,0	18,1	42	36,8
H12	100	0,1	18,1	67	116,2
H14	100	1,0	18,1	42	36,8
H16	50	0,1	18,1	53	72,1
H18	75	1,3	14,5	42	0,0
H20	33	0,55	14,5	34	0,0
H22	75	0,0	14,5	45	22,9
H24	117	0,55	14,5	73	98,4
H26	75	0,55	7,3	43	17,8
H28	75	0,55	21,7	39	5,7
H30 (C)	75	0,55	14,5	38	2,6
H32 (C)	75	0,55	14,5	32	0,0
H34 (C)	75	0,55	14,5	51	103,1

S= solubilização:  $\left(\frac{DQO_s}{DQO_T}\right)$

S<sub>p</sub> = aumento percentual na solubilização após o pré-tratamento:  $\left(\frac{S_f - S_i}{S_i}\right) \times 100$

[S<sub>f</sub> = solubilização após o pré-tratamento; S<sub>i</sub> = razão DQO<sub>s</sub>/DQO<sub>t</sub> da biomassa não tratada]

(C) = réplicas do ponto central

Fonte: elaboração própria (2022)

Por outro lado, as condições H18, H20 e H32 (1 h) e H19, H27 e H29 (4 h) não tiveram efeito sobre o grau de solubilização da biomassa. Os casos H19 e H20 se justificam pela baixa temperatura empregada. O pré-tratamento da biomassa mais concentrada a 75 °C com quantidade moderada de ácido (H27) se mostrou ineficaz

em ambas as durações testadas, não tendo provocado nenhum aumento quando realizado por 1 h. Já as condições H18 e H32 se diferenciam apenas na concentração de ácido empregada (1,3% v/v e 0,55% v/v, respectivamente), mas nenhuma delas foi capaz de incrementar a matéria orgânica solúvel.

Para os experimentos realizados durante 1 h (eq. 4.1), somente o termo linear da temperatura (T) influenciou a variável de resposta para um intervalo de confiança de 95% ( $p$ -value = 0,0416). Para os pré-tratamentos realizados por 4 h nenhum fator teve efeito significativo sobre o aumento da solubilização. No entanto, o termo linear da temperatura foi o que apresentou menor  $p$ -value (0,1710). Além disso, as réplicas do ponto central apresentaram resultados bastante discrepantes entre si (Tabela 4.3).

Portanto, os modelos obtidos apresentaram baixo coeficiente de correlação  $R^2$  (0,4950 e 0,5219 para 1 h e 4 h), refletindo um pobre ajuste dos resultados experimentais com os previstos pelas equações 4.1 e 4.2. A baixa acurácia dos modelos está relacionada às fontes de erro identificadas na condução dos experimentos, como experimentos realizados com cultivos de épocas distintas, vedação inadequada dos frascos, dificuldade no controle da temperatura com a placa de aquecimento e dificuldade em manter o equilíbrio térmico durante o pré-tratamento.

$$Sp_{1h}(\%) = 253,56 - 2,76T + 0,009T^2 - 165,78A + 96,66A^2 - 21,12B + 0,27B^2 + 0,79T \times A + 0,18T \times B + 1,10A \times B \quad (4.1)$$

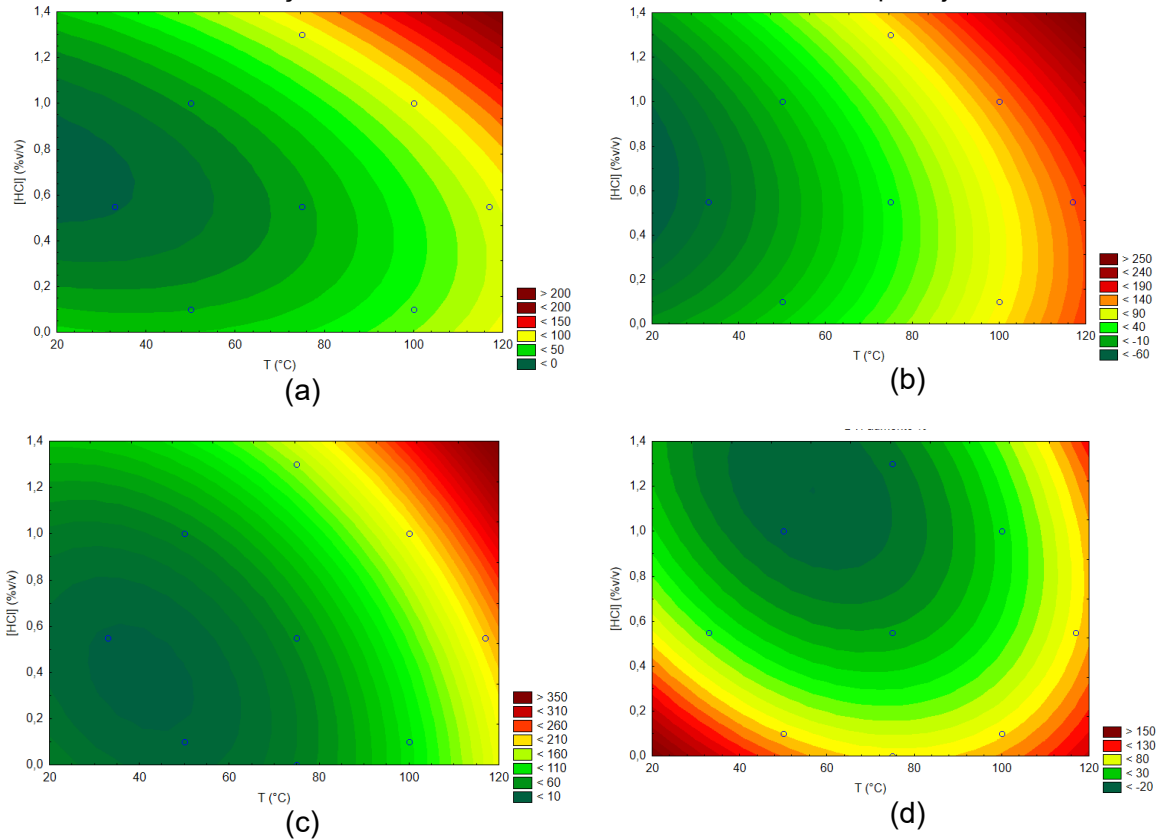
$$Sp_{4h}(\%) = -133,89 - 0,07T + 0,03T^2 + 125,69A + 84,43A^2 + 16,64B + 0,33B^2 + 1,12T \times A - 0,27T \times B - 21,54 A \times B \quad (4.2)$$

onde  $S_p$  representa o aumento percentual na solubilização da biomassa após o pré-tratamento, T = temperatura, A= concentração de ácido (% v/v), B = concentração de biomassa (mg SST/100 mL).

As superfícies de respostas obtidas a partir da equação 4.1 indicam que, tanto no caso da biomassa diluída quanto da concentrada, o aumento na solubilização foi maximizado por temperaturas maiores que 100°C e ácido concentrado (Fig. 4.13a e 4.13b). Já para a equação 4.2, as superfícies obtidas indicam tendências opostas para a biomassa diluída e concentrada. Embora ambos os casos sejam beneficiados por temperaturas superiores a 100 °C, a solubilização é maximizada ao utilizar ácido concentrado para a biomassa diluída (Fig. 4.13c), enquanto ácido diluído obtém resultados melhores no pré-tratamento da biomassa concentrada (Fig. 4.13d).

**Figura 4.13:** Superfícies de resposta T (°C) versus [HCl] (% v/v) do Planejamento 1 para a variável dependente Sp.

(a) experimentos com duração de 1 h e biomassa diluída; (b) experimentos com duração de 1 h e biomassa concentrada (c) experimentos com duração de 4 h e biomassa diluída; (d) experimentos com duração de 4 h e biomassa concentrada; ° = limites do planejamento



Fonte: elaboração própria (2022)

#### 4.4.2 Planejamento 2

De acordo com o Planejamento 1, maior solubilização ocorre em temperaturas superiores a 100 °C e ácido diluído é melhor para a biomassa concentrada, que é o foco principal deste trabalho. Assim, delineou-se um segundo planejamento experimental variando a concentração de ácido entre 0,1% e 1,0% v/v e explorando temperaturas entre 100 °C e 150 °C para a solubilização da biomassa densificada. Ao elevar a temperatura, optou-se por reduzir o tempo de pré-tratamento para 2 h, uma vez que tempo e temperatura possuem efeitos compensatórios, conforme observado na análise comparativa da literatura, e que maior duração não necessariamente produziu melhores resultados no Planejamento 1. Por fim, para eliminar as fontes de erro experimental que prejudicaram o Planejamento 1, foi utilizado um bloco digestor no lugar da placa aquecedora.

O segundo planejamento experimental resultou em 13 condições de pré-tratamento termoquímico com ácido clorídrico, incluindo as cinco replicatas do ponto

central. Os resultados de solubilização final (S) alcançada e o aumento percentual na solubilização ( $S_p$ ) da biomassa após o pré-tratamento são mostrados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4:** Resultados dos experimentos de pré-tratamento termoquímico do Planejamento 2

Experimento	Condições do pré-tratamento		S (%)	$S_p$ (%)
	T (°C)	HCl (% v/v)		
H1 (C)	125	0,55	25	0,0
H2	125	1,19	70	147,0
H3 (C)	125	0,55	35	22,2
H4	150	0,1	87	206,4
H5	125	0,0	57	100,2
H6	90	0,55	17	0,0
H7 (C)	125	0,55	36	28,7
H8	100	1,0	41	43,3
H9 (C)	125	0,55	32	13,1
H10 (C)	125	0,55	32	11,5
H11	100	0,1	47	66,7
H12	160	0,55	96	238,3
H13	150	1,0	108	281,0

$$S (\%) = \left( \frac{DQO_s}{DQO_t} \right) \times 100$$

$$S_p (\%) = \text{aumento percentual na solubilização após o pré-tratamento: } \left( \frac{S_f - S_i}{S_i} \right) \times 100$$

[ $S_f$  = solubilização após o pré-tratamento;  $S_i$  = razão  $DQO_s/DQO_t$  da biomassa não tratada]

(C) = réplicas do ponto central

Fonte: elaboração própria (2022)

As condições H4, H12 e H13 resultaram nos maiores aumentos de solubilização. Em H13, a solubilização da biomassa superou 100%, indicando completa conversão da biomassa em matéria orgânica solúvel. No entanto, material particulado ainda estava presente ao final do pré-tratamento. Na prática, solubilização  $\geq 100\%$  é possível pois compostos intracelulares são liberados pelo pré-tratamento (ref.). Além disso, a degradação da quitosana e do ácido acético (adicionados na etapa de coagulação/floculação) contribuem para a DQO solúvel. Menores resultados foram obtidos na condição de menor temperatura (H6) e em H1. No entanto, este último era uma réplica do ponto central e foi removido do conjunto de dados por ser a réplica com resultado mais distante das demais.

A análise estatística dos resultados experimentais do Planejamento 2 (Tabela 4.4) resultou em um modelo estatístico correspondente a uma função quadrática sem ponto de máximo na região delimitada pelos pontos do planejamento, e representada pela equação 4.3 ( $R^2 = 0,9870$ ).

$$S_p(\%) = 1219,46 - 20,24 \times T + 0,091 \times T^2 - 601,37 \times A + 315,62 \times A^2 + 2,18 \times T \times A \quad (4.3)$$

onde T = temperatura (°C) e A = concentração de HCl (% v/v)

Os parâmetros com maior influência (*p-value* < 0,05, intervalo de confiança 95%) sobre o aumento na solubilização da biomassa de cianobactérias (Tabela 4.5) foram o efeito do termo linear da temperatura (T), o termo quadrático da concentração de ácido (A<sup>2</sup>), o termo quadrático da temperatura (T<sup>2</sup>) e a interação entre os termos lineares da temperatura e concentração de ácido (TxA), respectivamente. Todos estes exercem efeitos positivos (Fig. 4.14), indicando que quanto maior T e A, maior será o aumento na solubilização.

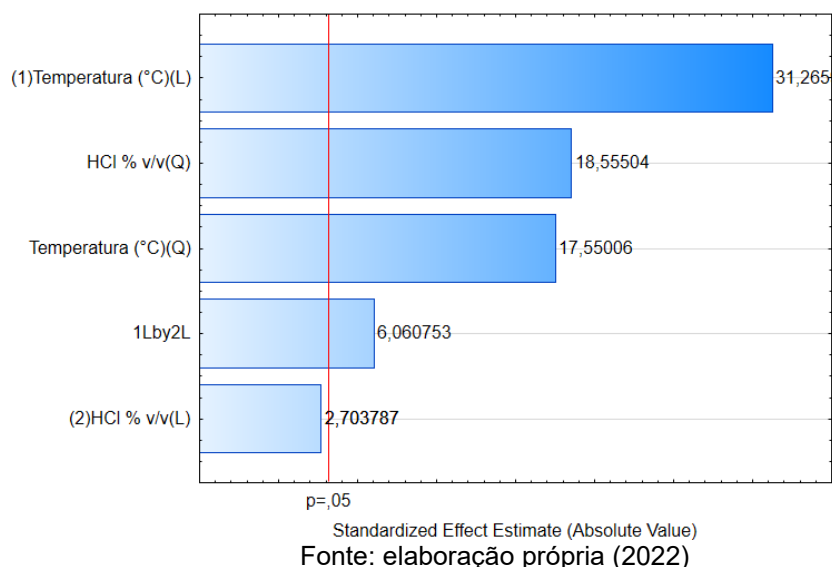
**Tabela 4.5:** *p-value* para os parâmetros do modelo do Planejamento 2

<b>Parâmetro</b>	<b><i>p-value</i></b>
T	0,000072
T <sup>2</sup>	0,000403
A	0,073550
A <sup>2</sup>	0,000342
TxA	0,009013

Fonte: Elaboração própria (2022)



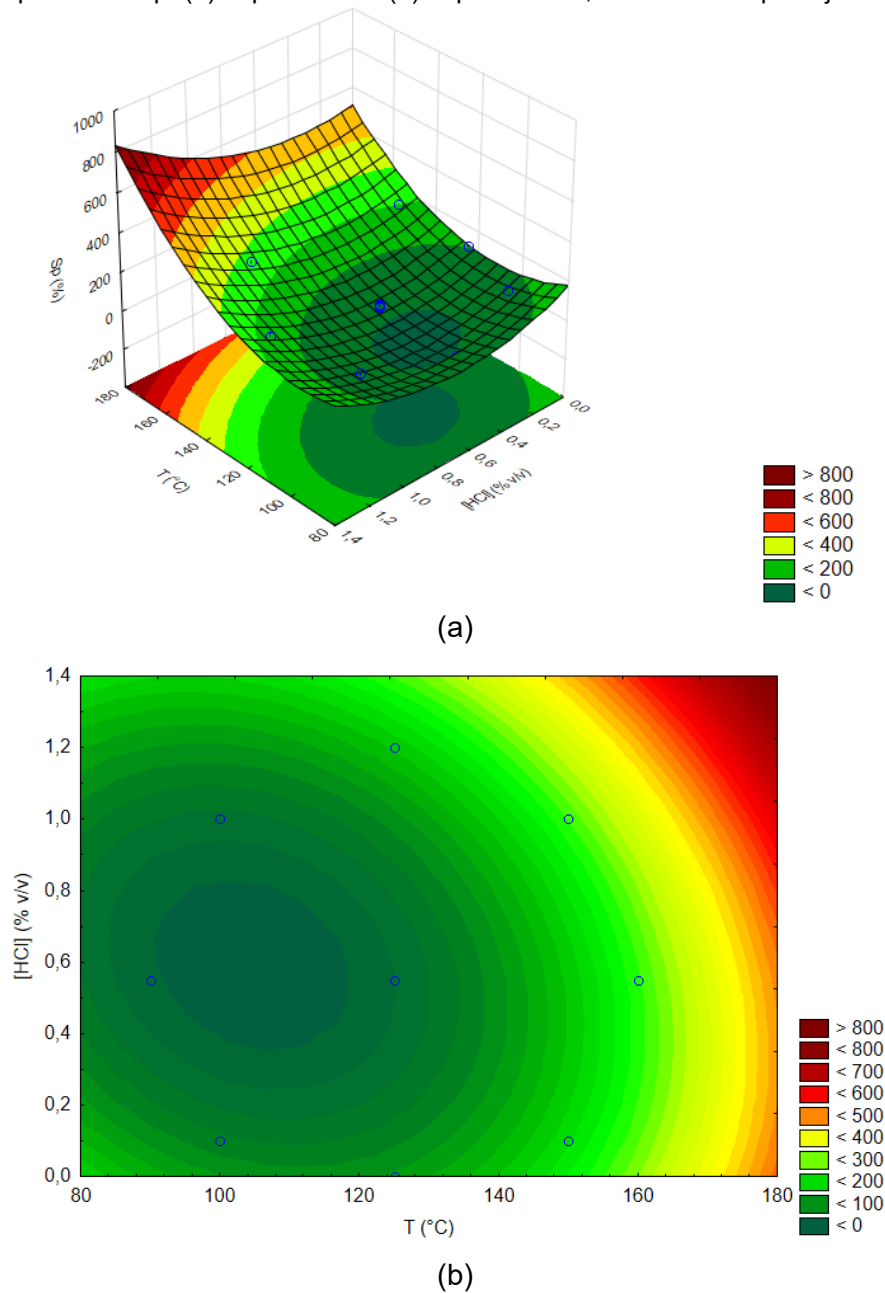
**Figura 4.104:** Gráfico de Pareto mostrando os principais parâmetros que influenciam o aumento na solubilização da biomassa nos experimentos de pré-tratamento termoquímico do Planejamento 2



A superfície de resposta do modelo (Fig. 4.15) aponta para aumentos na solubilização da biomassa de até 800% ao extrapolar a temperatura e a concentração de ácido acima dos limites superiores do planejamento. De fato, a solubilização tende a ser beneficiada com maiores temperaturas e concentrações de reagente uma vez que condições severas de pré-tratamento são eficientes para converter moléculas complexas em compostos mais simples e solúveis.

De um modo geral, observa-se que, ao manter a temperatura constante,  $S_p$  diminui com o aumento da concentração de ácido, atingindo o mínimo em 0,55% v/v e tornando a crescer em seguida. Quando  $100\text{ }^\circ\text{C} < T < 130\text{ }^\circ\text{C}$ , o modelo indica que mesmo os pré-tratamentos com ácido concentrado não ultrapassam os resultados obtidos sem a adição de ácido. Ou seja, o máximo valor de  $S_p$  nesta faixa de temperatura seria obtido pelo pré-tratamento térmico. Ainda assim, nestas condições os maiores aumentos na solubilização estariam ao redor dos 100%. Já para pré-tratamentos realizados em  $T > 140\text{ }^\circ\text{C}$ , o modelo aponta que a máxima solubilização é alcançada com ácido concentrado (1,0% v/v).

**Figura 4.15:** Superfícies de resposta T (°C) versus [HCl] (%v/v) do Planejamento 2 para a variável dependente Sp. (a) superfície 3D (b) superfície 2D; ° = limites do planejamento



Fonte: elaboração própria (2022)

No entanto, conforme discutido na seção 2.3.7 do capítulo de revisão bibliográfica, máxima solubilização não garante máxima produção de energia na digestão anaeróbia da biomassa algácea. Além disso, altas temperaturas e reagentes concentrados impactam diretamente na demanda energética e no custo econômico do processo. Por estas razões, preferiu-se buscar condições que produzissem um aumento satisfatório na solubilização da biomassa ao invés de seguir buscando pela maximização da variável de resposta. Assim, escolheu-se como condição inicial a temperatura de 160 °C que, de acordo com o modelo, levaria a  $S_p = 362\%$  com 1,0%

v/v de ácido. Nesta mesma temperatura, ao empregar ácido diluído (0,1% v/v) obteria-se 277% de solubilização, enquanto apenas o pré-tratamento térmico alcançaria  $S_p = 299\%$ . Assim, as condições 160 °C + 0% ácido (A) e 160 °C + HCl 0,1% v/v (B) foram selecionadas para validar experimentalmente o modelo de pré-tratamento da biomassa densificada, uma vez que permitiriam aumentar a solubilização em aproximadamente 4 vezes em comparação com a biomassa fresca.

De acordo com o modelo estatístico obtido com o Planejamento 2, a condição A resulta em maior  $S_p$  que a condição B. No entanto, o teste *t-Student* mostrou que não houve diferença estatística entre o pré-tratamento realizado com HCl diluído e o pré-tratamento térmico a 160 °C (*p-value* = 0,462). Avaliou-se também o uso de ácido sulfúrico na mesma concentração e temperatura escolhida anteriormente (condição C), para evitar a introdução de íons cloreto no meio e inibição da digestão anaeróbia, conforme explicitado no item 3.4 de Materiais e Métodos. O resultado obtido foi superior ao pré-tratamento com HCl e ao pré-tratamento térmico (Tabela 4.6), sendo estatisticamente diferente de ambas as condições (*p-value* = 0,041 e 0,001, respectivamente). Assim, a condição escolhida para pré-tratamento da biomassa foi T = 160°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1% v/v e duração de 2 h.

**Tabela 4.6:** Resultados de aumento de solubilização ( $S_p$ ) nas condições indicadas pelo Planejamento 2.

Condição	Descrição	$S_p$ (%)
A	160 °C	342 ± 0,1 <sup>a</sup>
B	160 °C + HCl 0,1% v/v	355 ± 0,3 <sup>a</sup>
C	160 °C + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1% v/v	407 ± 0,1 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais pelo teste *t-Student* (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: elaboração própria (2022)

Observou-se que o resultado obtido experimentalmente foi maior que o indicado pelo modelo para as condições A e B. Além disso, o modelo previu que a condição sem uso de ácido alcançaria maior  $S_p$ , no entanto, os experimentos levaram a resultados numericamente semelhantes e estatisticamente iguais.

#### 4.4.3 Pré-tratamento termoquímico da biomassa densificada

A biomassa do Cultivo 9 foi densificada por coagulação/floculação com quitosana (Tabela 4.7) antes de ser submetida ao pré-tratamento termoquímico.

**Tabela 4.7:** Caracterização da biomassa densificada

Parâmetro	Cultivo 9 densificado
pH	6,9
SST (g/L)	2,31
DQO total (g/L)	9,25
DQO solúvel (g/L)	0,64
S (%)	6,9

Fonte: elaboração própria (2022)

A Figura 4.16 mostra a biomassa densificada ao final do pré-tratamento com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,1% v/v) a 160 °C. Percebe-se que o pré-tratamento da biomassa levou à formação de uma fase líquida e a uma desagregação dos flocos formados na coagulação/floculação, deixando-os com o aspecto de particulado fino que sedimentava facilmente no fundo do frasco.

**Figura 4.16:** Biomassa densificada de *S. subsalsus* após o pré-tratamento termoquímico

Fonte: Acervo pessoal (2022)

Alcançou-se uma solubilização final de 25,8%, dentro da faixa de resultados reportados por outros autores para o pré-tratamento termoquímico com ácido da biomassa de microalgas e cianobactérias, compilados na Tabela 2.6. Este resultado é comparável com o trabalho de Marques *et al.* (2018), que obtiveram 37,5% de solubilização final da biomassa de *Scenedesmus* sp. aplicando 0,1% (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 150 °C e 1 h. Pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído tendem a ter um impacto leve a moderado sobre a solubilização da matéria orgânica de microalgas e

cianobactérias. Santos *et al.* (2014) alcançaram uma solubilização final de 8,4% no pré-tratamento de *Isochrysis galbana* com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2% (v/v) em condições amenas de temperatura (40 °C, 16h).

Por outro lado, o pré-tratamento realizado no presente trabalho resultou em um aumento expressivo na solubilização (S<sub>p</sub>) de 276%. O experimento preliminar realizado nas mesmas condições previu um S<sub>p</sub> maior (Tabela 4.6) ao hidrolisar um volume menor de biomassa. Ainda assim, este resultado está de acordo com a previsão do Planejamento 2 (277%), e foi superior aos obtidos por Marques *et al.* (2018) e Santos *et al.* (2014), 35,5% e 27,1%, respectivamente.

Apesar de não ser seletivo, o pré-tratamento termoquímico exhibe tendências distintas para diferentes espécies de microalgas e cianobactérias, o que torna difícil garantir sua eficiência em termos gerais. Fica claro que a solubilização da matéria orgânica é influenciada por mais fatores além das condições experimentais controladas. Portanto, mais estudos são necessários explorando não apenas tempo, temperatura e reagente, mas que também incluam características como a composição química das espécies utilizadas. Também é interessante investigar os compostos solúveis formados durante o pré-tratamento.

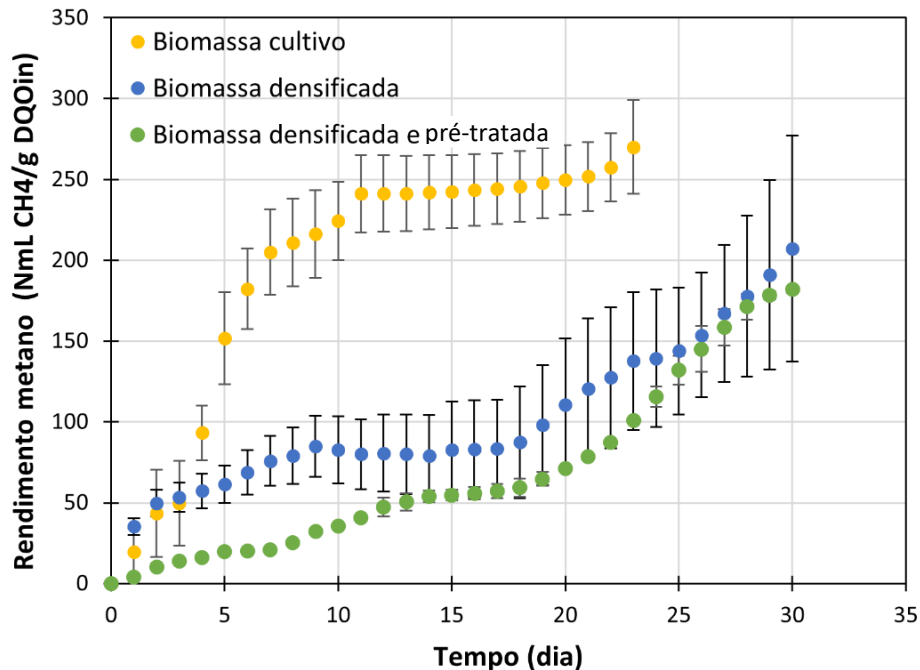
#### 4.5 Digestão anaeróbia da biomassa algácea

A produção de metano a partir da biomassa do cultivo (BMC) estabilizou-se dentro de 23 dias de ensaio, não tendo sido mais registrada produção após este tempo. Considerando que toda a DQO adicionada foi consumida pelos microrganismos e que cada 1 g DQO foi convertida a 350 NmL CH<sub>4</sub>, a digestão da biomassa fresca produziria um volume máximo de 23,1 NmL de metano. Para esta biomassa obteve-se um volume final de 17,8 NmL CH<sub>4</sub>, correspondendo a 77% do total teórico. Já para a biomassa densificada (BMD) obteve-se um volume acumulado de 106,1 NmL de metano, e 103,5 NmL CH<sub>4</sub> para a biomassa densificada e pré-tratada com ácido (BMDA) após 30 dias de ensaio. Estes valores correspondem, respectivamente, a 59% e 52% do máximo teórico. Em ambos os casos, os experimentos foram encerrados antes que a produção de metano estabilizasse, o que pode ter contribuído para os valores menores.

A Figura 4.17 mostra o rendimento em metano dos ensaios. O aumento do rendimento após um *plateau*, observado nos três casos, indica um provável comportamento de diauxia. Percebe-se que a curva correspondente à biomassa do

cultivo fresco possui um *plateau* de maior duração que as demais, nas quais o comportamento de diauxia parece mais acentuado. Pode-se dizer que este aumento é originário da biomassa, pois este comportamento não ocorreu com os brancos.

**Figura 4.11:** Rendimento em metano da digestão anaeróbia da biomassa algácea



Fonte: elaboração própria (2022)

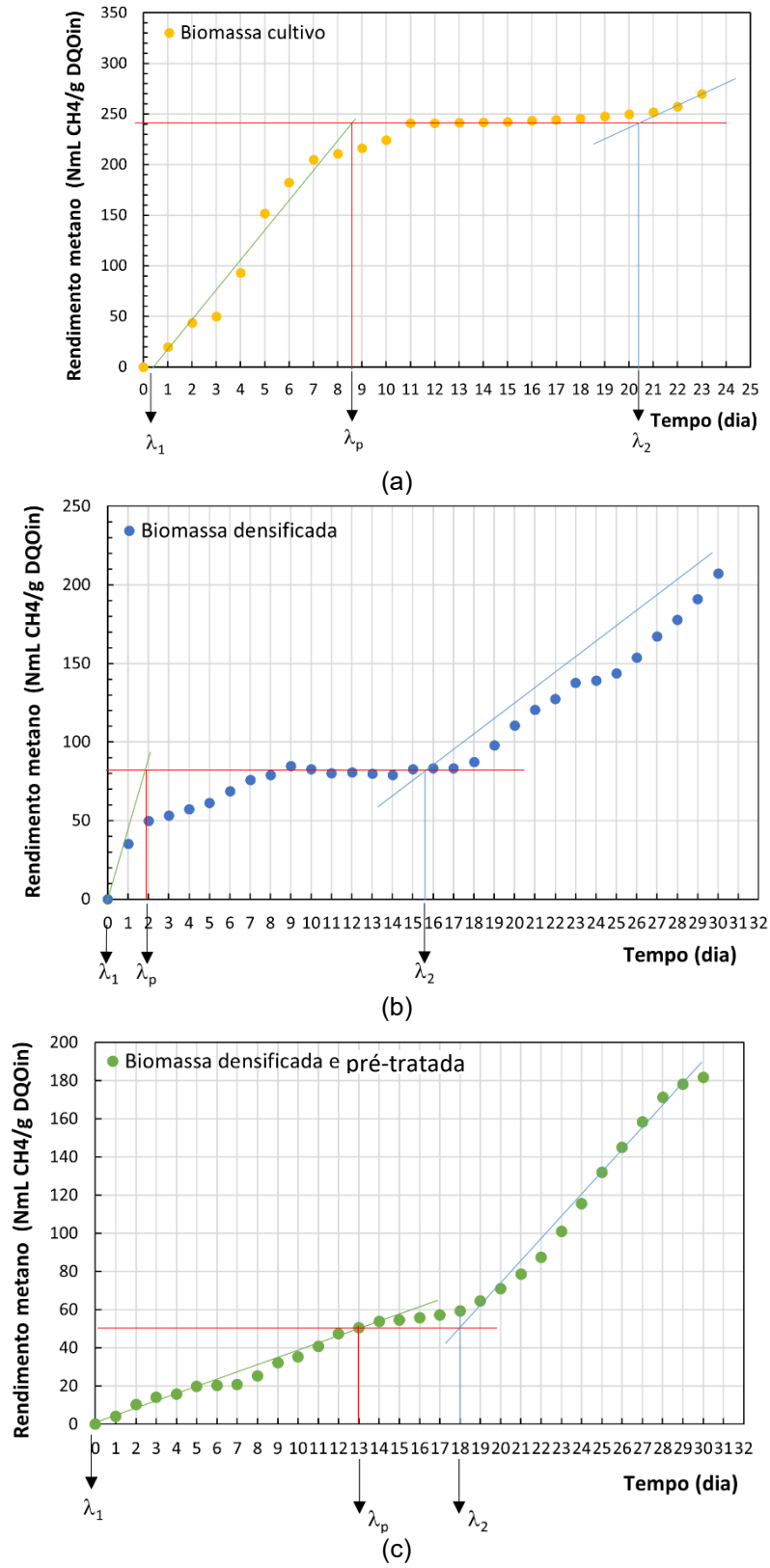
O comportamento de diauxia é comum na digestão de materiais cuja composição é uma mistura de moléculas facilmente degradáveis (como ácidos orgânicos voláteis e açúcares simples) e moléculas complexas. Na primeira fase, moléculas mais simples são convertidas a metano até que a produção atinge um *plateau*. Em seguida, a segunda fase se inicia e mais metano é produzido a partir da conversão dos componentes complexos da matéria-prima. Outras razões para a ocorrência de diauxia incluem a adaptação dos microrganismos e o acúmulo de ácidos voláteis (GOMES; STRANGFELD; MEYER, 2021). No caso das matérias-primas BMD e BMDA, o comportamento de diauxia pode ser atribuído à presença de ácido acético e quitosana, o primeiro sendo um componente simples e o segundo um polímero complexo. Além disso, o pré-tratamento termoquímico da biomassa densificada provocou uma mudança em seu aspecto macroscópico, formando uma fase líquida e uma fase particulada, o que provavelmente favoreceu ainda mais a digestão dos componentes simples e dos complexos em fases separadas. O comportamento diáuxico é indesejado, e indica a necessidade de otimização das condições de digestão anaeróbia de forma que todo metano seja produzido em uma única etapa.

O rendimento obtido na digestão anaeróbia da biomassa fresca da cianobactéria *S. subsalsus* foi de  $269,7 \pm 29,0$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>. Este valor é superior aos reportados na literatura para biomassa de microalgas como *Scenedesmus* sp. (MARQUES *et al.*, 2018) e *Chlorella vulgaris* (MENDEZ *et al.*, 2013). Não obstante, faltam na literatura referências sobre a produção de metano com a espécie utilizada, bem como informações a respeito de sua composição química e estrutura celular, o que torna difícil avaliar parâmetros importantes, como a relação C/N, que poderiam ser usados para otimizar as condições de digestão anaeróbia desta biomassa.

Ao contrário do esperado, o rendimento das biomassas BMD e BMDA foram inferiores ao da biomassa do cultivo (BMC), obtendo-se  $207,2 \pm 70$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub> e  $181,8 \pm 1,9$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>, respectivamente, após 30 dias de ensaio. Ainda assim, não é raro observar rendimentos inferiores após o pré-tratamento químico e termoquímico da biomassa algácea. Pré-tratamento químico com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de *C. vulgaris* diminuiu em 18,6% o rendimento em metano da digestão anaeróbia (MENDEZ *et al.*, 2013). No trabalho de Santos *et al.* (2014), o pré-tratamento termoquímico com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2%v/v foi 37,8% menor que o da biomassa bruta de *Isochrysis galbana*.

Obteve-se um bom ajuste dos dados experimentais do ensaio com BMC ao modelo de Gompertz, que apontou para um rendimento máximo de 237,96 NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>adic</sub>. Contudo, os modelos de Gompertz e de Gompertz modificado para os ensaios com BMD e BMDA indicavam rendimentos inverossímeis ao final da estabilização da segunda fase de produção de metano. Assim, os parâmetros cinéticos desses ensaios foram calculados graficamente, conforme ilustra a Figura 4.18. Os resultados são apresentados na Tabela 4.8.

**Figura 4.18:** Estimativa gráfica dos parâmetros cinéticos dos ensaios de digestão anaeróbia. (a) biomassa do cultivo; (b) biomassa densificada; (c) biomassa densificada e pré-tratada





**Tabela 4.8:** Parâmetros cinéticos dos ensaios de digestão anaeróbia

<b>Parâmetros</b>	<b>BMC</b>	<b>BMD</b>	<b>BMDA</b>
$\lambda_1$ (d)	0,4	0	0
$\lambda_2$ (d)	20,4	17	18
$\lambda_p$ (d)	8,6	2	13
Plateau (d)	11,8	15	5
$\mu_1$ (NmL/g.d)	29,7	35,3	3,7
$\mu_2$ (NmL/g.d)	na	9,1	12,3
$A_1$ (NmL/g)	242,7	81,6	55,4
$A_1+A_2$ (NmL/g)	na	207,2	181,8

$\lambda$  = fase *lag*;  $\mu$  = taxa de crescimento específico; A = máxima produção de metano

na = não se aplica

1 = primeira etapa de produção de metano; 2 = segunda etapa de produção de metano

Fonte: elaboração própria (2022)

A partir dos dados da Tabela 4.8, percebe-se que a primeira etapa de produção de metano ( $\lambda_1$ ) iniciou-se em tempos semelhantes para as três biomassas, com a fase *lag* praticamente inexistente (0 dias). Comparando BMC com BMD, pode-se dizer que a taxa máxima de produção de metano da primeira etapa ( $\mu_1$ ) foi semelhante em ambos os casos. No entanto, a fase de estabilização da produção iniciou-se com apenas 2 dias de ensaio em BMD, enquanto que em BMC o *plateau* foi alcançado após o oitavo dia ( $\lambda_p = 8,6$ ). A duração do *plateau* foi maior para BMD (15 dias) do que para BMC (11,8 dias), apontando para o efeito da maior concentração de biomassa e, ainda, da quitosana. A digestão da biomassa densificada implica em uma maior quantidade de matéria orgânica complexa que deverá ser assimilada pelos microrganismos, sem contar o efeito recalcitrante da própria quitosana dada sua natureza polimérica. Sendo assim, o surgimento do *plateau* pode ser atribuído à necessidade de adaptação dos microrganismos a uma carga maior de compostos orgânicos complexos e aos desdobramentos desta condição, como, por exemplo, flutuações no pH e formação de intermediários inibitórios. Não obstante, percebe-se, ainda, que tanto BMC quanto BMD iniciaram a segunda fase de produção de metano em tempos semelhantes. A principal diferença, porém, está no fato de que, para a biomassa densificada, a maior produção de metano foi observada durante a segunda etapa. Por outro lado, na digestão da biomassa do cultivo, o metano foi produzido majoritariamente na primeira etapa, com uma contribuição apenas residual da segunda.

Comparando-se os parâmetros cinéticos da biomassa densificada (BMD) com os da biomassa densificada e que foi submetida ao pré-tratamento com ácido (BMDA),

mais uma vez percebe-se que a primeira etapa de produção de metano iniciou-se em tempos semelhantes em ambos os casos, havendo também ausência de fase *lag* ( $\lambda_1 = 0$ ). A taxa máxima de produção na primeira etapa ( $\mu_1$ ) foi quase dez vezes menor para BMDA que para BMD. No entanto, apesar da digestão mais lenta, a primeira etapa teve duração mais longa em BMDA, uma vez que a estabilização da produção de metano ocorreu somente após 13 dias de ensaio, contra 2 dias no caso de BMD. Adicionalmente, a duração do *plateau* foi reduzida, indicando que o pré-tratamento termoquímico pode auxiliar a reduzir ou mesmo eliminar o comportamento díáuxico. Já a segunda etapa de produção de metano foi iniciada em tempos semelhantes ( $\lambda_2 = 17$  e 18 dias, respectivamente), porém a maior taxa máxima de produção de metano para esta etapa ( $\mu_2$ ) foi observada para BMDA. Possivelmente, o pré-tratamento termoquímico com ácido facilitou a degradação de compostos recalcitrantes, que puderam ser usados na segunda etapa de produção. Por fim, a segunda etapa de produção foi responsável pela maior parte do metano gerado com ambas as biomassas.

O rendimento máximo de metano obtido com a biomassa densificada foi 15% menor que o rendimento final da biomassa do cultivo. A introdução de quitosana para realizar a coagulação/floculação pode ter prejudicado a formação de metano dada sua natureza polimérica, dificultando a sua degradação. Com respeito à biomassa submetida ao pré-tratamento termoquímico com ácido diluído, apesar de seu rendimento em metano ter sido 25% inferior ao da biomassa do cultivo, foi possível verificar efeitos positivos do pré-tratamento sobre a digestão anaeróbia. De um modo geral, os parâmetros cinéticos apontaram para uma melhor degradabilidade da biomassa pré-tratada, e atenuação do comportamento de diauxia, retardando o início da etapa de estabilização e diminuindo a sua duração em comparação com a biomassa densificada. No entanto, não descarta-se a ocorrência de algum desequilíbrio durante os ensaios, dado o menor rendimento obtido a partir desta biomassa.

No caso de BMD e de BMDA, o pH ao final da digestão anaeróbia encontrava-se ao redor de 8,2, acima do pH inicial dos ensaios e da faixa ideal para a digestão anaeróbia. Isto pode ser atribuído à formação de amônia durante a degradação da biomassa e à baixa capacidade tamponante do meio. Muitas vezes o lodo anaeróbio possui uma capacidade tamponante intrínseca, capaz de resistir às flutuações de pH que derivam da degradação da matéria orgânica. Porém, neste caso isso não ocorreu,

logo, seria necessária a adição de uma solução tampão no início dos ensaios. Além disso, no caso de BMDA, pode-se citar um provável efeito do sulfato proveniente do  $H_2SO_4$  utilizado no pré-tratamento. Embora cal tenha sido adicionada para precipitar o sulfato na forma de  $CaSO_4$ , não foi possível separar este precipitado da biomassa pré-tratada, uma vez que parte dela assumiu um aspecto particulado. Logo, não houve como garantir que o sulfato de cálcio precipitado tenha se mantido como tal durante a digestão. Ainda assim, é importante ressaltar que os experimentos com BMD e BMDA foram interrompidos em 30 dias, mesmo antes da completa estabilização da produção de metano, o que prejudicou a comparação dos ensaios e dos rendimentos finais.

Não obstante, as condições de digestão precisam ser otimizadas a fim de aumentar o rendimento em tempos mais curtos de processo. Além disso, determinar a composição química da matéria-prima utilizada através de métodos analíticos, bem como da fração líquida da digestão anaeróbia, poderia enriquecer a avaliação dos resultados, elucidando o papel da composição desta biomassa no pré-tratamento proposto e a identificação dos compostos por ele solubilizados.

Por fim, cabe ressaltar que para avaliar o real comportamento da digestão anaeróbia de materiais orgânicos que apresentam padrão de diauxia, recomenda-se que os experimentos sejam repetidos nas mesmas condições. Portanto, os resultados apresentados aqui são considerados apenas preliminares. Uma vez confirmado este comportamento, alguns ajustes podem ser realizados para melhorar a digestão anaeróbia, como utilizar um inóculo adaptado à matéria-prima ou às condições reacionais quando estas fogem das ideais. Isto seria interessante particularmente no caso da biomassa densificada, uma vez que a concentração de matéria orgânica é muito maior, favorecendo o acúmulo de intermediários que causam efeitos inibitórios, como a amônia proveniente da degradação das proteínas e os ácidos orgânicos oriundos da degradação dos carboidratos. Não obstante, conforme observado, o pré-tratamento termoquímico contribuiu para atenuar a diauxia, logo, otimizar as condições de pré-tratamento também pode ser uma saída para eliminar este comportamento indesejado.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

A coagulação/floculação da biomassa de *S. subsalsus* com quitosana realizada neste estudo alcançou uma eficiência de floculação de  $89,9 \pm 6,7\%$  e um fator de concentração de  $27,5 \pm 1,5$ . Constatou-se que elevadas eficiências foram obtidas por quitosana de qualidade laboratorial e industrial, o que pode facilitar a aplicação deste processo em larga escala.

A partir do levantamento bibliográfico da literatura especializada sobre o pré-tratamento da biomassa algácea visando à produção de metano, foi possível constatar que embora os pré-tratamentos com NaOH sejam amplamente utilizados, a eficiência deste método para a biomassa algácea é questionável, uma vez que a maior parte dos estudos analisados obtiveram um aumento no rendimento em metano inferior a 20%. Em contraste, faltam dados sobre pré-tratamentos com ácido à temperatura ambiente. Sendo assim, mais estudos são necessários para avaliar o efeito deste método sobre a digestão anaeróbia da biomassa algácea.

Ainda no levantamento realizado, não foi encontrada nenhuma correlação entre o aumento na solubilização da biomassa algácea e o aumento no rendimento em metano obtidos após os pré-tratamentos com álcalis ou com ácido, confirmando uma tendência já conhecida. As análises realizadas apontaram que o pré-tratamento termoquímico com ácido diluído em temperaturas amenas e duração prolongada seria preferível, resultando em condições pouco severas. Com respeito ao balanço energético, apenas os métodos enzimáticos e, em alguns casos, o térmico, alcançaram um balanço energético positivo, com mais energia sendo produzida que consumida. Isto aponta para a necessidade de otimizar as condições de pré-tratamento, bem como em explorar a integração desta etapa com demais processos existentes em biorrefinarias ou estações de tratamento de efluentes onde a biomassa algácea seria processada.

Já no que diz respeito ao pré-tratamento termoquímico da biomassa densificada, através dos experimentos realizados durante a pesquisa aqui apresentada observou-se que tanto a temperatura quanto a concentração de ácido exerceram influência positiva sobre o aumento na solubilização. Além disso, o modelo obtido não apontou para um ponto de máximo, indicando apenas que quanto maior temperatura e concentração, maior o aumento na solubilização. O pré-tratamento

termoquímico da biomassa densificada de *S. subsalsus* a 160°C, 2 h e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1% v/v levou a um aumento na solubilização de 276%.

A digestão anaeróbia da biomassa, avaliada de forma preliminar, apresentou uma produção de metano em duas fases, comportamento também conhecido como diauxia, comum em materiais formados por componentes mais simples e outros de difícil degradação. Este comportamento foi observado para a biomassa fresca e para as biomassas densificadas com quitosana e e hidrolisada, indicando que é causado por características da própria biomassa. Ainda assim, a biomassa fresca resultou em um rendimento em metano de  $269,7 \pm 29,0$  NmL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>i</sub>, maior do que o de espécies de microalgas comumente avaliadas, como *Scenedesmus* sp. e *Chlorella vulgaris*. Por outro lado, o rendimento da biomassa densificada e da biomassa densificada submetida ao pré-tratamento ácido foram 15 e 25% menores, respectivamente, que os da biomassa fresca. Maior concentração de matéria orgânica pode ter favorecido o acúmulo de intermediários de degradação, levando a desequilíbrios nos reatores. O pH final da digestão das biomassas densificadas com quitosana e hidrolisada, em torno de 8,2, corrobora com a hipótese de formação de amônia, um composto conhecidamente inibitório em altas concentrações.

Comparando os parâmetros cinéticos, no entanto, observou-se efeitos positivos do pré-tratamento realizado, o qual foi capaz de atenuar o comportamento diáuxico e de aumentar a digestibilidade da biomassa densificada.

## 5.2 Sugestões

Mesmo produzindo um elevado aumento na solubilização da biomassa, o pré-tratamento termoquímico da biomassa densificada não proporcionou o efeito esperado de incrementar a produção de metano. Este resultado não é uma novidade nesta área de estudo, mesmo assim, mais estudos são necessários para propor um método mais eficaz do ponto de vista da digestão anaeróbia e que também seja tecnicamente viável. Para isto, sugere-se:

- determinar a composição química da biomassa do cultivo em termos de carboidratos, lipídeos e proteínas. Com esta informação, seria possível determinar parâmetros importantes como a razão C/N, que por sua vez ajudaria a otimizar a digestão anaeróbia;
- avaliar o pré-tratamento térmico da biomassa, a fim de evitar o efeito inibitório da adição de ácido;

- otimizar as condições de digestão anaeróbia, por exemplo, permitindo adaptação do lodo à biomassa densificada com a quitosana;
- finalizar os ensaios de digestão anaeróbia somente após a completa estabilização da produção de metano;
- realizar um estudo mais minucioso, empregando análises químicas para caracterizar a fração líquida durante a digestão anaeróbia, possibilitando identificar a formação de compostos inibitórios.

## REFERÊNCIAS

- ALZATE, M. E.; MUÑOZ, R.; ROGALLA, F.; FDZ-POLANCO, F.; PÉREZ-ELVIRA, S. I. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488–494, 1 nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.113>.
- AMIN, F. R.; KHALID, H.; ZHANG, H.; RAHMAN, S.; ZHANG, R.; LIU, G.; CHEN, C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **AMB Express**, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 117–129, 2004. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23. ed. [S. l.: s. n.], 2017.
- ARIUNBAATAR, J.; PANICO, A.; ESPOSITO, G.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. **Applied Energy**, v. 123, p. 143–156, 15 jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.035>.
- ASLAM, A.; FAZAL, T.; ZAMAN, Q. uz; SHAN, A.; REHMAN, F.; IQBAL, J.; RASHID, N.; UR REHMAN, M. S. Biorefinery of Microalgae for Nonfuel Products. **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 197–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00013-8>.
- ATELGE, M. R.; ATABANI, A. E.; BANU, J. R.; KRISA, D.; KAYA, M.; ESKICIOGLU, C.; KUMAR, G.; LEE, C.; YILDIZ, Y.; UNALAN, S.; MOHANASUNDARAM, R.; DUMAN, F. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, n. March, p. 117494, 15 jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações técnicas para o monitoramento de cianobactérias/cianotoxinas nos mananciais de abastecimento de água para o consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BOHUTSKYI, P.; BETENBAUGH, M. J.; BOUWER, E. J. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 366–372, 1 mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.095>.
- BOHUTSKYI, P.; BOUWER, E. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis and research needs. In: LEE, J. W. (org.). **Advanced Biofuels and Bioproducts**. New York: [s. n.], 2012. v. 9781461433, p. 873–975. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4>.
- CANDIA-LOMELI, M.; TAPIA-RODRÍGUEZ, A.; MORALES-IBARRÍA, M.; RAZO-FLORES, E.; CELIS, L. B. Anaerobic Digestion Under Alkaline Conditions from Thermochemical Pretreated Microalgal Biomass. **BioEnergy Research**, v. 15, n. 1, p. 346–356, 10 mar. 2022. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10325-w>.
- CASTENHOLZ, R. W. *General Characteristics of the Cyanobacteria*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [S. l.]: Wiley, 2015. p. 1–23. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019>.

CAVINATO, C.; UGURLU, A.; DE GODOS, I.; KENDIR, E.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. Biogas production from microalgae. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 155–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00007-8>.

CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Flocculation and electroflocculation for algal biomass recovery. **Biofuels from Algae**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 257–286. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00011-1>.

CHEN, L.; WANG, C.; WANG, W.; WEI, J. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 9–15, 1 abr. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071>.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>.

CHENG, Q.; DENG, F.; LI, H.; QIN, Z. H.; WANG, M.; LI, J. Nutrients removal from the secondary effluents of municipal domestic wastewater by *Oscillatoria tenuis* and subsequent co-digestion with pig manure. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 39, n. 24, p. 3127–3134, 17 dez. 2018. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1375020>.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. 2 ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2019.

CHO, S.; PARK, S.; SEON, J.; YU, J.; LEE, T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 330–336, 1 set. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.017>.

CHOO, M. Y.; OI, L. E.; LING, T. C.; NG, E. P.; LEE, H. V.; JUAN, J. C. Conversion of Microalgae Biomass to Biofuels. **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**, , p. 149–161, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00010-2>.

CÓRDOVA, O.; PASSOS, F.; CHAMY, R. Enzymatic Pretreatment of Microalgae: Cell Wall Disruption, Biomass Solubilisation and Methane Yield Increase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 3, p. 787–797, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03044-8>.

CÓRDOVA, O.; PASSOS, F.; CHAMY, R. Physical Pretreatment Methods for Improving Microalgae Anaerobic Biodegradability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 1, p. 114–126, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2646-6>.

CÓRDOVA, O.; SANTIS, J.; RUIZ-FILLIPI, G.; ZUÑIGA, M. E.; FERMOSO, F. G.; CHAMY, R. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. October 2017, p. 2806–2813, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.005>.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; SANTOS, T. D.; MITCHELL, B. G.; MORAIS, M. G. Open pond systems for microalgal culture. **Biofuels from Algae**, , p. 199–223, 1 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00009-3>.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; ANTONIO, J.; MUYLEAERT, K.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MAGDALENA, J. A.; MUYLEAERT, K.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. High methane yields in anaerobic digestion of the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. **Algal Research**, v. 44, n. October, p. 101689, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101689>.



D'HONDT, E.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; BOLADO, S.; KASPEROVICIENE, J.; KOREIVIENE, J.; SULCIUS, S.; ELST, K.; BASTIAENS, L. Cell disruption technologies. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**, , p. 133–154, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>.

DEPARTAMENTO DE ENERGIA (Estados Unidos). **National Algal Biofuels Technology Review**. 2016. Disponível em < <https://www.osti.gov/biblio/1259407/>>. Acesso em

DE CARVALHO, J. C.; MAGALHÃES, A. I.; DE MELO PEREIRA, G. V.; MEDEIROS, A. B. P.; SYDNEY, E. B.; RODRIGUES, C.; AULESTIA, D. T. M.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. **Bioresource Technology**, v. 300, n. October 2019, p. 122719, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122719>.

DU, X.; TAO, Y.; LIU, Y.; LI, H. Stimulating methane production from microalgae by alkaline pretreatment and co-digestion with sludge. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 41, n. 12, p. 1546–1553, 24 maio 2020. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1540665>.

DVOŘÁK, P.; CASAMATTA, D. A.; HAŠLER, P.; JAHODÁŘOVÁ, E.; NORWICH, A. R.; POULÍČKOVÁ, A. Diversity of the Cyanobacteria. **Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 3–46. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5_1).

FERREIRA, L. C.; DONOSO-BRAVO, A.; NILSEN, P. J.; FDZ-POLANCO, F.; PÉREZ-ELVIRA, S. I. Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 251–257, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.065>.

FRIEDLINGSTEIN, P.; JONES, M. W.; O'SULLIVAN, M.; ANDREW, R. M.; HAUCK, J.; PETERS, G. P.; PETERS, W.; PONGRATZ, J.; SITCH, S.; LE QUÉRÉ, C.; DBAKKER, O. C. E.; CANADELL1, J. G.; CIAIS1, P.; JACKSON, R. B.; ANTHONI1, P.; BARBERO, L.; BASTOS, A.; BASTRIKOV, V.; BECKER, M.; ... ZAEHLE, S. Global carbon budget 2019. **Earth System Science Data**, v. 11, n. 4, p. 1783–1838, 4 dez. 2019. <https://doi.org/10.5194/essd-11-1783-2019>.

FRIGON, J.-C.; MATTEAU-LEBRUN, F.; HAMANI ABDOU, R.; MCGINN, P. J.; O'LEARY, S. J. B.; GUIOT, S. R. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 108, p. 100–107, ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.051>.

GHASIMI, D. S. M.; ABOUDI, K.; DE KREUK, M.; ZANDVOORT, M. H.; VAN LIER, J. B. Impact of lignocellulosic-waste intermediates on hydrolysis and methanogenesis under thermophilic and mesophilic conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 181–191, 1 jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.045>.

GIMÉNEZ, J. B.; BOUZAS, A.; SECO, A.; AGUADO, D.; FERRER, J. Use of rumen microorganisms to boost the anaerobic biodegradability of microalgae. **Algal Research**, v. 24, n. May, p. 309–316, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.003>.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic Digestion of Algae. **Applied Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 47–55, 1957a. <https://doi.org/10.1128/am.5.1.47-55.1957>.

GOLUEKE, C. G.; OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Anaerobic Digestion of Algae. **Applied Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 47–55, jan. 1957b. <https://doi.org/10.1128/am.5.1.47-55.1957>.

GOMES, C. S.; STRANGFELD, M.; MEYER, M. Diauxie Studies in Biogas Production from Gelatin and Adaptation of the Modified Gompertz Model: Two-Phase Gompertz Model. **Applied Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1067, 25 jan. 2021. <https://doi.org/10.3390/app11031067>.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 610–616, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.043>.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 40, p. 105–111, 1 maio 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.008>.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Cristina; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J.-P. P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. 2011 Society of Chemical Industry and John Wiley & Sons, Ltd. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, n. 6, p. 205–218, 1 mar. 2012. <https://doi.org/10.1002/bbb.337>.

GUTIÉRREZ, R.; PASSOS, F.; FERRER, I.; UGGETTI, E.; GARCÍA, J. Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production. **Algal Research**, v. 9, p. 204–211, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.010>.

HANAKI, K.; MATSUO, T.; NAGASE, M. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 7, p. 1591–1610, 1 jul. 1981. <https://doi.org/10.1002/bit.260230717>.

HOM-DIAZ, A.; PASSOS, F.; FERRER, I.; VICENT, T.; BLÁNQUEZ, P. Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. **Algal Research**, v. 19, p. 184–188, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.006>.

JACKSON, R. B. . B.; FRIEDLINGSTEIN, P. .; ANDREW, R. M. . .; CANADELL, J. G. ; LE QUÉRÉ, C.; PETERS, G. P. ; QUÉRÉ, C. L. .; PETERS, G. P. ; Persistent fossil fuel growth threatens the Paris Agreement and planetary health. **Environmental Research Letters**, v. 14, n. 12, 2019. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab57b3>.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 692–709, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045>.

JIANG, Y.; MCADAM, E.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C.; LONGHURST, P. Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, p. 100899, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2019.100899>.

KENDIR ÇAKMAK, E.; UGURLU, A. Enhanced biogas production of red microalgae via enzymatic pretreatment and preliminary economic assessment. **Algal Research**, v. 50, p. 101979, 1 set. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2020.101979>.

KHANAL, S. K. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications**, , p. 1–301, 27 mar. 2009. <https://doi.org/10.1002/9780813804545>.

KIM, Jaai; YU, Y.; LEE, C. Thermo-alkaline pretreatment of waste activated sludge at low-temperatures: Effects on sludge disintegration, methane production, and methanogen community structure. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 194–201, 1 set. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.115>.

KIM, Jeongsik; PARK, C.; KIM, T.-H. H.; LEE, M.; KIM, S.-W. W. S.; KIM, S.-W. W. S.; LEE, J. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 3, p. 271–275, 1 jan. 2003. <https://doi.org/10.1263/jbb.95.271>.

KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Filamentous Cyanobacteria. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**, , p. 135–235, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9>.

KOUTRA, E.; TSAFRAKIDOU, P.; SAKARIKA, M.; KORNAROS, M. Microalgal Biorefinery. **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**, , p. 163–185, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00011-4>.

KRÖGER, M.; MÜLLER-LANGER, F. Review on possible algal-biofuel production processes. **Biofuels**, v. 3, n. 3, p. 333–349, 9 maio 2012. <https://doi.org/10.4155/bfs.12.14>.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 491–500, 1 jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.041>.

LAMA, S.; MUYLEAERT, K.; KARKI, T. B.; FOUBERT, I.; HENDERSON, R. K.; VANDAMME, D. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 464–470, 1 nov. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080>.

LEE, K.; CHANTRASAKDAKUL, P.; KIM, D.; KONG, M.; PARK, K. Y. Ultrasound pretreatment of filamentous algal biomass for enhanced biogas production. **Waste Management**, v. 34, n. 6, p. 1035–1040, jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.012>.

LIMA, A. C. P. de. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de  $\beta$ -mananases, açúcares e metano a partir da biomassa residual do processamento de açaí (*Euterpe oleracea*)**. 2020. 195 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

LÓPEZ TORRES, M.; ESPINOSA LLORÉNS, M. del C. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. **Waste Management**, v. 28, n. 11, p. 2229–2234, 1 nov. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.10.006>.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed, Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032p.

MAGDALENA, J. A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNANDEZ, C. Efficient anaerobic digestion of microalgae biomass: Proteins as a key macromolecule. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1–16, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23051098>.

MAGDALENA, J. A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Archaea inhibition: Strategies for the

enhancement of volatile fatty acids production from microalgae. **Waste Management**, v. 102, p. 222–230, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.044>.

MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. **Energy**, v. 78, p. 48–52, 15 dez. 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.05.052>.

MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. **Energy Conversion and Management**, v. 85, p. 551–557, set. 2014b. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.097>.

MARKOU, G.; ILKIV, B.; BRULÉ, M.; ANTONOPOULOS, D.; CHAKALIS, L.; ARAPOGLOU, D.; CHATZIPAVLIDIS, I. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal biomass after the extraction of valuable compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 2, p. 419–426, fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00703-3>.

MARQUES, A. de L.; PINTO, F. P.; ARAÚJO, O. Q. d. F.; CAMMAROTA, M. C. Assessment of methods to pretreat microalgal biomass for enhanced biogas production. **Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems**, v. 6, n. 2, p. 394–404, 2018. <https://doi.org/10.13044/j.sdewes.d5.0193>.

MARTÍN JUÁREZ, J.; RIOL PASTOR, E.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MUÑOZ TORRE, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; BOLADO RODRÍGUEZ, S. Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 30–38, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.063>.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. Part III, Toxic Materials and Their Control. **Public Works**, v. 95, p. 91–94, 1964. .

MENDEZ, L.; MAHDY, A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. **Applied Energy**, v. 129, p. 238–242, set. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.04.110>.

MENDEZ, L.; MAHDY, A.; DEMUEZ, M.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. **Fuel**, v. 117, n. PART A, p. 674–679, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.032>.

MENDEZ, L.; MAHDY, A.; TIMMERS, R. A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 136–141, 1 dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.136>.

MENDEZ, L.; SIALVE, B.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; STEYER, J. P.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Comparison of *Chlorella vulgaris* and cyanobacterial biomass: cultivation in urban wastewater and methane production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 5, p. 703–712, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1551-7>.

MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 165–178, jun. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>.

MOHD YUNOS, F. H.; NASIR, N. M.; WAN JUSOH, H. H.; KHATOON, H.; LAM, S. S.; JUSOH, A. Harvesting of microalgae (*Chlorella* sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 124, p. 243–249, 1 out. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.016>.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491–515, 1 jan. 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).

MUSSGNUG, J. H. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 51–56, 1 out. 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>.

MUSTAFA, H. M.; HAYDER, G.; JAGABA, A. H. Microalgae: A Renewable Source for Wastewater Treatment and Feedstock Supply for Biofuel Generation. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 7431–7444, 17 jun. 2020.  
<https://doi.org/10.33263/BRIAC111.74317444>.

OLIVEIRA, H. R. **Biofloculação de cianobactérias com pellets do fungo *Aspergillus niger***. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

OLIVEIRA, H. R.; BASSIN, I. D.; CAMMAROTA, M. C. Bioflocculation of cyanobacteria with pellets of *Aspergillus niger*: Effects of carbon supplementation, pellet diameter, and other factors in biomass densification. **Bioresource Technology**, v. 294, n. September, p. 122167, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122167>.

OMETTO, F.; QUIROGA, G.; PŠENIČKA, P.; WHITTON, R.; JEFFERSON, B.; VILLA, R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. **Water Research**, v. 65, p. 350–361, 15 nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.040>.

OMETTO, F.; WHITTON, R.; COULON, F.; JEFFERSON, B.; VILLA, R. Improving the Energy Balance of an Integrated Microalgal Wastewater Treatment Process. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 2, p. 245–253, 9 abr. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9230-2>.

OREN, A. Cyanobacteria: Biology, ecology and evolution. **Cyanobacteria: An Economic Perspective**. [S. l.]: Wiley Blackwell, 2013. p. 1–20.  
<https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch1>.

PADAN, E. Facultative Anoxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, n. 1, p. 27–40, jun. 1979.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.30.060179.000331>.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 349–355, 3 jun. 2010.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-009-9465-2>.

PARK, K. Y.; KWEON, J.; CHANTRASAKDAKUL, P.; LEE, K.; CHA, H. Y. Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. **International**

**Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 598–602, nov. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.035>.

PASSOS, F.; ASTALS, S.; FERRER, I. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2098–2103, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.004>.

PASSOS, F.; CARRETERO, J.; FERRER, I. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound.

**Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 667–672, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.065>.

PASSOS, F.; FELIX, L.; ROCHA, H.; PEREIRA, J. de O.; DE AQUINO, S. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 305–312, 1 jun. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.006>.

PASSOS, F.; FERRER, I. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. **Water Research**, v. 68, p. 364–373, jan. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.015>.

PASSOS, F.; FERRER, I. Microalgae Conversion to Biogas: Thermal Pretreatment

Contribution on Net Energy Production. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n.

12, p. 7171–7178, 17 jun. 2014. <https://doi.org/10.1021/es500982v>.

PASSOS, F.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Impact of low temperature pretreatment on the

anaerobic digestion of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 79–86,

2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.114>.

PASSOS, F.; GUTIÉRREZ, R.; UGGETTI, E.; GARFÍ, M.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Towards energy neutral microalgae-based wastewater treatment plants. **Algal Research**, v. 28, p.

235–243, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.006>.

PASSOS, F.; SOLÉ, M.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Biogas production from microalgae grown

in wastewater: Effect of microwave pretreatment. **Applied Energy**, v. 108, p. 168–175, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.042>.

PENAUD, V.; DELGENÈS, J. P.; MOLETTA, R. Thermo-chemical pretreatment of a

microbial biomass: Influence of sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic

biodegradability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3–5, p. 258–263, 1 ago.

1999. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00037-X).

PETERS, G. P.; ANDREW, R. M.; CANADELL, J. G.; FRIEDLINGSTEIN, P.; JACKSON, R.

B.; KORSBAKKEN, J. I.; LE QUÉRÉ, C.; PEREGON, A. Carbon dioxide emissions continue

to grow amidst slowly emerging climate policies. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 1, p. 3–6,

1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0659-6>.

PRAJAPATI, S. K.; MALIK, A.; VIJAY, V. K. Comparative evaluation of biomass production

and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. **Applied**

**Energy**, v. 114, p. 790–797, fev. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.08.021>.

QIU, Y.; FREAR, C.; CHEN, S.; NDEGWA, P.; HARRISON, J.; YAO, Y.; MA, J. Accumulation

of long-chain fatty acids from *Nannochloropsis salina* enhanced by breaking microalgae cell

wall under alkaline digestion. **Renewable Energy**, v. 149, p. 691–700, 1 abr. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.093>.

QUINN, J. C.; HANIF, A.; SHARVELLE, S.; BRADLEY, T. H. Microalgae to biofuels: Life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 37–43, nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.037>.

RAS, M.; LARDON, L.; BRUNO, S.; BERNET, N.; STEYER, J.-P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 200–206, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.146>.

REVIERS, B. de. Divisão Cyanophyta. **Biologia e Filogenia das Algas**. 1ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 21–33.

RINCÓN-PÉREZ, J.; RAZO-FLORES, E.; MORALES, M.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; CELIS, L. B. Improving the Biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by Thermochemical Pretreatment to Produce Hydrogen and Methane. 2019. .

RODRIGUEZ, C.; ALASWAD, A.; MOONEY, J.; PRESCOTT, T.; OLABI, A. G. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p. 765–779, 22 abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.06.027>.

ROSELET, F.; VANDAMME, D.; MUYLEAERT, K.; ABREU, P. C. Harvesting of Microalgae for Biomass Production. **Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 211–243. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_10).

RUSTEN, B.; SAHU, A. K. Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 6, p. 1195–1201, 1 set. 2011. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.722>.

SALAMA, E.-S.; KURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; EL-DALATONY, M. M.; YANG, I.-S.; MIN, B.; JEON, B.-H. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1189–1211, nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>.

SAMSON, R.; LEDUY, A. Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 10, p. 671–676, out. 1983. <https://doi.org/10.1007/BF01386360>.

SANTOS, L. B. **Densificação de biomassa de cianobactéria por coagulação/floculação e aproveitamento da fração líquida nos cultivos**. 2022. Não paginado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (em fase de elaboração).

SANTOS, N. O.; OLIVEIRA, S. M.; ALVES, L. C.; CAMMAROTA, M. C. Methane production from marine microalgae *Isochrysis galbana*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 60–67, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.091>.

SCARCELLI, P. G.; SEREJO, M. L.; PAULO, P. L.; BONCZ, M. Á. Evaluation of biomethanization during co-digestion of thermally pretreated microalgae and waste activated sludge, and estimation of its kinetic parameters. **Science of The Total Environment**, v. 706, p. 135745, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135745>.

SHARMA, N. K.; STAL, L. J. The economics of cyanobacteria-based biofuel production:

Challenges and opportunities. **Cyanobacteria: An Economic Perspective**. [S. l.]: Wiley Blackwell, 2013. p. 167–180. <https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch10>.

SHOW, K.-Y.; YAN, Y.-G.; LEE, D.-J. **Algal biomass harvesting and drying**. Second Edi. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00007-x>.

SINGH, V.; CHAUDHARY, D. K.; MANI, I.; DHAR, P. K. Recent advances and challenges of the use of cyanobacteria towards the production of biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 1–10, 1 jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.099>.

ŞIRIN, S.; TROBAJO, R.; IBANEZ, C.; SALVADÓ, J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1067–1080, 5 set. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9736-6>.

ŠMARDÁ, J.; ŠMAJS, D.; KOMRSKA, J.; KRZYŹÁNEK, V. S-layers on cell walls of cyanobacteria. **Micron**, v. 33, n. 3, p. 257–277, 1 jan. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(01\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00031-2).

SOLÉ-BUNDÓ, M.; CARRÈRE, H.; GARFÍ, M.; FERRER, I. Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). **Algal Research**, v. 24, p. 199–206, 1 jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.025>.

SPOSOB, M.; KIM, D. H.; YUN, G. S.; YUN, Y. M. Assessment of the relationship between solubilization and biogas production on anaerobic digestion of pretreated lipid-extracted microalgae waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105702, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105702>.

STANIER, R. Y.; BAZIRE, G. C. Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 225–274, out. 1977. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.001301>.

SUKIAS, J.; CRAGGS, R. Enhanced Methane Yields From Microalgal Digestion With Various Pre-Treatments. 25., 2006. **Proceedings of the 7th IWA Specialist Group Conference on Waste Stabilization Ponds** [...]. Bangkok, Thailand: [s. n.], 2006. v. 25.

TORRES, I. G.; RINCÓN, B.; BARTACEK, J.; BORJA, R.; JEISO, D. Challenges for Cost-Effective Microalgae Anaerobic Digestion. **Biodegradation - Engineering and Technology**. [S. l.]: InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/55975>.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233–239, 1 abr. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.005>.

VASSALLE, L.; PASSOS, F.; ROSA-MACHADO, A. T.; MOREIRA, C.; REIS, M.; FREITAS, M. P.; FERRER, I.; MOTA, C. R. The use of solar pre-treatment as a strategy to improve the anaerobic biodegradability of microalgal biomass in co-digestion with sewage. **Chemosphere**, v. 286, p. 131929, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131929>.

WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X. Q.; ZHANG, X. Y.; GUO, S. L.; HO, S. H.; CHANG, J. S.; BAI, F. W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresour. Technol.**, v. 184, p. 251–257, 1 maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>.



WANG, M.; SAHU, A. K.; RUSTEN, B.; PARK, C. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 585–590, ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.096>.

WANG, S.; MUKHAMBET, Y.; ESAKKIMUTHU, S.; ABOMOHRRA, A. E.-F. Integrated microalgal biorefinery – Routes, energy, economic and environmental perspectives. **Journal of Cleaner Production**, v. 348, p. 131245, maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131245>.

WARD, A. J.; LEWIS, D. M.; GREEN, F. B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. **Algal Research**, v. 5, n. 1, p. 204–214, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>.

WILSON, C. A.; NOVAK, J. T. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4489–4498, 1 out. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.022>.

XIAO, C.; LIAO, Q.; FU, Q.; HUANG, Y.; CHEN, H.; ZHANG, H.; XIA, A.; ZHU, X.; REUNGSANG, A.; LIU, Z. A solar-driven continuous hydrothermal pretreatment system for biomethane production from microalgae biomass. **Applied Energy**, v. 236, p. 1011–1018, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.12.014>.

YEN, H.; BRUNE, D. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 130–134, jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.010>.

YENIGÜN, O.; DEMIREL, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5–6, p. 901–911, 1 maio 2013. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.04.012>.

YOUSUF, A. Fundamentals of Microalgae Cultivation. **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1>.

KANNAH, R. Y.; KAVITHA, S.; KARTHIKEYAN, O. P.; RENE, E. R.; KUMAR, G.; BANU, J. R. A review on anaerobic digestion of energy and cost effective microalgae pretreatment for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125055, jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125055>.

ZABED, H. M.; AKTER, S.; YUN, J.; ZHANG, G.; ZHANG, Y.; QI, X. Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109503>.

ZAMALLOA, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. **Applied Energy**, v. 92, p. 733–738, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.017>.

ZENG, S.; YUAN, X.; SHI, X.; QIU, Y. Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n. 1–3, p. 89–93, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.047>.

ZHAO, B.; MA, J.; ZHAO, Q.; LAURENS, L.; JARVIS, E.; CHEN, S.; FREAR, C. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 423–430, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.079>.

ZHU, L.; LI, Z.; HILTUNEN, E. Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction.

**Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 28 jun. 2018.

<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>.

## APÊNDICE – Artigo publicado no periódico Fermentation

Review

# Microalgae and cyanobacteria biomass pretreatment methods: a comparative analysis of chemical and thermochemical pretreatment methods aimed at methane production

Maria C. de Oliveira <sup>1</sup>, Isabelli D. Bassin <sup>2</sup> and Magali C. Cammarota <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Chemical and Biochemical Process Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro; mclara@eq.ufrj.br

<sup>2</sup> Department of Biochemical Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro; isabelli@eq.ufrj.br (I. D. Bassin), christe@eq.ufrj.br (M. C. Cammarota)

\* Correspondence: christe@eq.ufrj.br (M. C. Cammarota)

**Abstract:** Anaerobic digestion of microalgae and cyanobacteria was first proposed as a destination for algal biomass accumulated on stabilization ponds since it could not be disposed of directly in the environment. Now, the versatility of algal biomass makes them a suitable candidate to produce biofuels and other biomolecules in biorefineries. Anaerobic digestion of biomass is advantageous because it does not require the extraction of specific cellular constituents or drying of the biomass. Nevertheless, challenges remain regarding biomass concentration and their resistant cell walls, which are factors that could hamper methane yield. Many pretreatment methods, including chemical and thermochemical, have been proposed to break down the complex polymers present on the cell wall into smaller molecules. Unfortunately, the relationship between biomass solubilization and methane yield is not well defined. This article intends to review the anaerobic digestion of algal biomass and the role of chemical and thermochemical pretreatments in enhancing methane production. Several pretreatment conditions selected from the scientific literature were compared to verify which conditions actually improve methane yield. The severity of the selected pretreatments was also assessed using the combined severity factor. Results suggest that thermochemical pretreatment in less severe conditions is most efficient, leading to a greater increase in methane yield. Only enzymatic pretreatments and some thermal pretreatments result in a positive energy balance. The large-scale implementation of pretreatment methods requires technological innovations to reduce energy consumption and its integration with other processes in wastewater treatment plants.

**Keywords:** anaerobic digestion; methane; algal biomass; chemical pretreatment; thermochemical pretreatment.

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Fermentation* 2022, 8, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname  
Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors.

Submitted for possible open access

publication under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

y/4.0/).

## 1. Introduction

Interest on renewable energy sources based on algal biomass conversion has increased due to the versatility of such biomass for biofuel production, such as biogas/biomethane, biodiesel, biohydrogen, bioethanol, and biobutanol, depending on the chosen technology [1,2].

Biogas generation through anaerobic digestion of the algal biomass eliminates some of the difficulties that lead to the high cost of biofuel generation from algae, namely: drying, extraction of intracellular molecules, and conversion to energy. Anaerobic digestion is also advantageous over other conversion routes because it allows wastewater reuse, nutrient recycling, maximum biomass utilization, minimum sludge generation, low operational costs, low-energy demand, and sustainable production of biogas [3,4]. Some authors suggest that methane production through anaerobic digestion is the most economically feasible route for an energy product generated from microalgae [5,6].

However, some technical and economic obstacles are still present for anaerobic digestion of this kind of biomass, particularly fresh microalgae recalcitrance, low C/N ratio, accumulation of volatile fatty acids in the digester, and low methane yield [7,8]. The suitability of microalgae for biogas production has been extensively investigated to clarify various aspects and try to improve the efficiency of the process and its general sustainability [2,8-19]. Most authors agree that algal biomass is an attractive feedstock to produce biofuels (biodiesel, biogas, bioethanol) and high-value products (drugs, nutraceuticals, chemicals). However, innovative and efficient techniques are needed to make large-scale production of algal biomass possible. Nonetheless, few studies suggest solutions to fill in the gaps, especially for algal biomass pretreatment. Kannah et al. [16], for instance, propose a two-stage pretreatment, combining a cell wall weakening step followed by the actual pretreatment to minimize the energy cost of microalgae conversion to biofuel. Other authors propose the integration between different routes of biofuel production and high-value products to increase energy generation and minimize the costs of biomass cultivation [2,19].

This article makes an extensive survey of the literature on algal biomass pretreatment methods, in particular chemical and thermochemical, aimed to increase methane yield and make its production feasible. Chemical and thermochemical pretreatment methods were selected for further study because they are common methods for other biomasses (lignocellulosic, organic waste, waste activated sludge) and are already used on a large scale. Such factors would be an advantage over other methods, which are still on the bench scale (ultrasound and microwave) or are more expensive (biological). The correlation between biomass solubilization and methane yield, as well as the chemical and thermochemical pretreatment conditions that effectively increase the methane yield, allowing for a positive energy balance, are also discussed in this review. The review is structured as follows: first, an overview of the anaerobic digestion process is described, with a focus on anaerobic digestion of algal biomass, then the algal biomass pretreatment methods and the influencing factors were assessed, finishing with a comparative analysis of chemical and thermochemical pretreatments methods of algal biomass and an energy efficiency assessment of those methods. The novelty of the study is a comparative analysis of these pretreatment methods to indicate the best method and the best approach to reach higher methane yield.

## **2. Anaerobic digestion**

Anaerobic digestion is a complex biochemical process comprised of several sequential reactions in the absence of free oxygen. The conversion of organic matter to biogas can be understood as a four-step process:

hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. Each of these steps is carried out by hydrolytic, acidogenic, and acetogenic bacteria and methanogenic archaea [20,21].

The typical composition of the gas mixture that makes up biogas is 50% to 75% methane, 25 to 45% carbon dioxide, and minor components such as hydrogen, nitrogen, oxygen, hydrogen sulfide, ammonia, and carbon monoxide. Methane is an energy rich component, and its biogas content varies depending on the feedstock added to the process, the digestion system, the temperature, and the detention time [22]. Biogas containing 50% methane has a heating value of 21 MJ/Nm<sup>3</sup>, and depending on the flow rate, it can be used in combustion engines, incorporated into a gas distribution grid (after proper treatment), fed to a boiler, or used to generate electricity [23].

The advantages of anaerobic digestion that it does not require high temperature or pressure; recycling and recovering of nutrients, since the effluent can be applied as fertilizer or soil amendment; and energy recovery whenever the technical, economic, and environmental aspects are deemed adequate. The disadvantages are the specialists need for project design, building, and operation (increasing in complexity as the scale grows); process depends largely on temperature control; definition of how the recovered energy is going to be used (for heat, power, or combined generation); sludge may require additional treatment (aerobic composting, humification on drying bed); treated effluent may have unattractive characteristics thus requiring post-treatment (physical-chemical or aerobic); the sensibility of methanogenic archaea to a number of chemicals; reactor start-up time may be long due to the low growth rate of anaerobic microorganisms; sulfur compounds can have a bad odor; small and medium scale anaerobic technology for solid waste treatment in low or middle income countries is still relatively new. The main challenges of anaerobic digestion are methane loss, relatively long treatment time, and process instability [24,25].

All kinds of biomass can be used as substrate for biogas production as long as their main components are carbohydrates, proteins, lipids, cellulose, and hemicellulose. Theoretical biogas yield varies depending on the distribution of the biomass constituents; each dry ton (total solids) of carbohydrates, proteins, and lipids generates 790-800, 700, and 1200-1500 Nm<sup>3</sup> of biogas containing 50, 70-71, and 67-68% of methane, respectively. However, methane content higher than the theoretical is possible, since CO<sub>2</sub> remains partially solubilized in the liquid phase, also known as digestate [26].

Substrates for anaerobic digestion can be solid, sludge, and liquids either concentrated or diluted. Some examples are sewage; sewage treatment sludge; animal manure; organic fraction of municipal solid waste; food waste from households, restaurants, and hotels; industrial and commercial organic waste (food processing, beverages, meat, dairy); agricultural waste and by-products; energy crops (eucalyptus, energy-cane, sorghum, elephant grass); and residual organic material from bioethanol and biodiesel production. Currently, the most widely used substrates for biogas generation are sludge from sewage treatment, animal manure, agricultural waste, and food industry waste. Other less commonly used and explored materials for biogas production are marine biomass (algae and ascidians) and woody biomass from short rotation forests, such as willow. The agricultural sector is generally the main substrate provider for biogas production due to the large number of

residues generated on farms (animal manure, straw, harvest waste) and the possibility of growing specific crops for bioenergy (e.g., energy-cane) [27].

Many biomasses studied for biofuels production present major drawbacks. Energy crops (corn, sugarcane, and plant oil) used to produce first-generation biofuels compete with food cultivation. Production of second-generation biofuels from lignocellulosic or woody biomass, agricultural waste, and municipal solid waste face many obstacles, including their low biomass productivity, demand for large amounts of water and arable land, and lack of efficient and low-energy pretreatments. Mass cultivation of oilseeds for biodiesel production leads to extensive deforestation and changes in land use that have serious impacts on biodiversity and make it harder to reach a sustainable production of biofuels from such biomass. Third-generation biofuels are mainly connected to algal biomass, and its feedstock is the key difference between second and third-generation biofuels [28,29].

### 3. Anaerobic digestion of algal biomass

Gouleke et al. [30] were the first authors to describe the anaerobic digestion of algal biomass when they investigated the digestion of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus*. Other research followed that aimed to identify key factors that might hamper the anaerobic digestion of algal biomass [31-44].

Microalgae and cyanobacteria are promising feedstocks for technological applications due to its simple nutritional demands and high biomass productivity. Provided the appropriate conditions, they grow 5 to 10 times faster than terrestrial biomass [45]. As they grow, microalgae mitigate CO<sub>2</sub> emissions by absorbing carbon and removing nutrients from wastewater [46-49]. Furthermore, microalgae cultivation does not require arable land or fresh water, making it possible to grow them in wastewater. These advantages increase the attractiveness of this biomass [50,51].

Algal biomass contains mostly lipids (2-55%), proteins (6-71%), and carbohydrates (4-64%). The proportion of these macromolecules varies in different species and growth conditions. The diversity of biochemical composition among different phyla, genera, and even between similar species may represent a challenge to anaerobic digestion of algal biomass [8]. Table 1 shows the typical macromolecular composition of technologically relevant microalgae species, as well as their cell wall composition.

**Table 1.** Approximate chemical composition and cell wall components of biotechnologically relevant microalgae.

Species	Chemical composition (%)			Cell wall components <sup>1</sup>
	Carbohydrates	Proteins	Lipids	
<i>Spirulina</i>	16	71	7	Polysaccharides sheath; lipid double-layer; peptide-glycan layer surrounded by a fibrillar layer made of cellulose and hemicellulose; cell membrane.
<i>Scenedesmus</i>	17	56	14	Peptide-glycan layer; algaenan layer; fibrillar layer made of cellulose and hemicellulose; cell membrane.
<i>Nannochloropsis</i>	32	27	15	Algaenan layer; cellulose layer; struts; cell membrane.

<i>Chlorella</i>	17	58	22	Algaenan layer; fibrillar layer made of cellulose and hemicellulose; cell membrane.
------------------	----	----	----	---

<sup>1</sup> From the most external to the most internal layer. Adapted from [52,53].

Environmental and operational factors can significantly affect microalgae cultivation and anaerobic digestion kinetics, diminishing biomass and biogas productivity. Light intensity, nutrient availability, temperature, pH, turbulence, and salinity are key factors influencing microalgae cultivation and biomass production [54]. Biogas production during anaerobic digestion is affected by C/N ratio, total solids, hydraulic retention time (HRT), volumetric organic load, pH, temperature, among other factors [55].

The risk of inhibition by ammonia-nitrogen is also a limitation that should be considered in the anaerobic digestion of microalgae. This type of biomass often has a low C/N ratio due to its high protein content, which may be an issue since high ammonia concentrations inhibit anaerobic microorganisms. Even when strategies to enhance microalgae digestibility are applied, ammonia-nitrogen release may occur during the degradation of nitrogen compounds [56,57].

In addition to theoretical calculations, lab-scale and pilot-scale experiments have demonstrated the excellent potential of microalgae anaerobic digestion for methane production, obtaining specific yields higher than from other biomasses. Mussnug et al. [40] achieved methane yield from microalgae biomass 7–13% higher than from corn silage. The first study about anaerobic digestion of microalgae biomass, conducted by Gouleke et al. [30], reached methane yields of 0.17–0.32 L CH<sub>4</sub>/g volatile solids (VS) from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus*. Studying the anaerobic digestion of two microalgae species, *Phaeodactylum tricorutum* and *Scenedesmus obliquus*, Zamalloa et al. [58] obtained methane yield of 0.36 and 0.24 L CH<sub>4</sub>/g VS, respectively. According to Song et al. [59], the methane yields of brown, red, and green macroalgae are 0.204 – 0.380 L CH<sub>4</sub>/g VS, 0.132 – 0.447 L CH<sub>4</sub>/g VS, and 0.152 – 0.330 L CH<sub>4</sub>/g VS, respectively, which are significantly higher than methane yields from sugar crops (0.189±0.072 L CH<sub>4</sub>/g VS) and lignocellulosic biomass (0.172±0.113 L CH<sub>4</sub>/g VS). Methane production may vary depending on algae habitat. When studying 15 species of fresh water microalgae and 5 species of marine microalgae, Frigon et al. [60] reported methane yields of 0.298 ± 0.083 L/g vs. for marine microalgae and 0.329 ± 0.043 L/g vs. for freshwater microalgae.

Table 2 shows methane yield results from mesophilic anaerobic digestion of different microalgae species. Note that the methane yields vary greatly depending on the species, due to the chemical composition of the microalgae and its cell wall robustness. Species that lack a cell wall, e. g., *Dunaliella salina*, usually have higher yields. Such species have a cell membrane constituted only by a lipidic double-layer and easily degradable components [52]. Other species like *Chlamydomonas reinhardtii* have a glycoprotein cell wall, which is also readily degradable, thus leading to satisfactory methane yields [61]. Nevertheless, most species have a robust cell wall, with many layers of cellulose, hemicellulose, algaenan, pectin, peptide-glycan, among other constituents, as is the case of *Chlorella* sp. [15,52]. Such polymers make up resistant cell walls, hindering access to the intracellular material, therefore hampering methane production. Algaenan, for example, is an extremely resistant aliphatic polymer that can be found in the cell wall of most microalgae

species. Polymeric chain size and structure vary according to the species, ranging from 30 to as much as 120 carbons, as is the case of *Nannochloropsis* sp. and *Scenedesmus communis* [52].

It is still unknown which species from fresh or marine water are more suitable for methane production. Despite the recent developments regarding methane production from algal biomass, screening of strains is still necessary to identify which ones combine the most desirable characteristics: easy cultivation, high biomass productivity, and easy anaerobic biodegradation. Given the results in Table 2, selection of ideal strains is one of the most important tasks for biogas production from algal biomass, since species composition directly influences methane production.

Although the microalgae cell wall is an important feature that directly influences anaerobic digestion, the literature still lacks information about cell wall chemical composition and structure for most species. The cell wall is different from one species to another, especially its constituents, inter- and intramolecular bonds, number of layers, and thickness [77]. The chemical nature of the cell wall is an important feature when choosing the right biomass for a biotechnological process, because to access the intracellular content and convert it into biogas, cell wall should be easily broken to minimize the costs, time, and energy required [78].



1 **Table 2.** Methane yields from mesophilic anaerobic digestion of different microalgae species.

<b>Algae species</b>	<b>Anaerobic digestion process conditions</b>	<b>Methane yield (mL CH<sub>4</sub>/g VS)</b>	<b>Reference</b>
Algae biomass: <i>Chlorella</i> sp. and <i>Scenedesmus</i> sp.	Batch reactor, 35°C, 105 days	260	[42]
Algae biomass: <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35 °C, 46 days	117	[62]
Algae biomass: <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Monorraphidium</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., <i>Amphora</i> sp.	Continuous reactor, 37 °C, 20 days, OLR 1.05 kg COD/m <sup>3</sup> .d	180	[63]
<i>Arthrospira maxima</i>	ADMFC, 35 °C, 4 days, OLR 0.5 kg DW/m <sup>3</sup> .d	173	[64]
<i>Arthrospira platensis</i>	Batch reactor, 38 °C, 32 days	293	[40]
<i>Chlorella kessleri</i>		218	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		387	
<i>Dunaliella salina</i>		323	
<i>Euglena gracilis</i>		325	
<i>Scenedesmus obliquus</i>		178	
<i>Botryococcus brauna</i>	Batch reactor, 35 °C, 34 – 50 days	343 – 370	[60]
<i>Chlamydomonas</i> sp.		333	
<i>Isochrysis</i> sp.		408	
<i>Scenedesmus dimorphus</i>		397	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Batch reactor, 35 °C, 22 days	263	[61]
<i>Chlorella vulgaris</i>		191	
<i>Chlorella</i>	Batch reactor, 37 °C, 45 days	123	[65]
<i>Chorella minutissima</i>	Batch reactor, 36 °C, 30 days	166	[66]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		265	
<i>Chlorella vulgaris</i>		196	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Batch reactor, 30 °C, 42 days	220 – 280	[67]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Batch reactor, 40 °C, 71-108 days	212	[68]
<i>Chlorella vulgaris</i>		189	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35 °C, 28 days	240	[69]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35°C, 35 days	237	[43]
<i>Chlorella vulgaris</i> after lipid extraction		219	
<i>Chlorella vulgaris</i> after chlorophyll extraction		210	
<i>Chlorella vulgaris</i> after protein extraction		207	

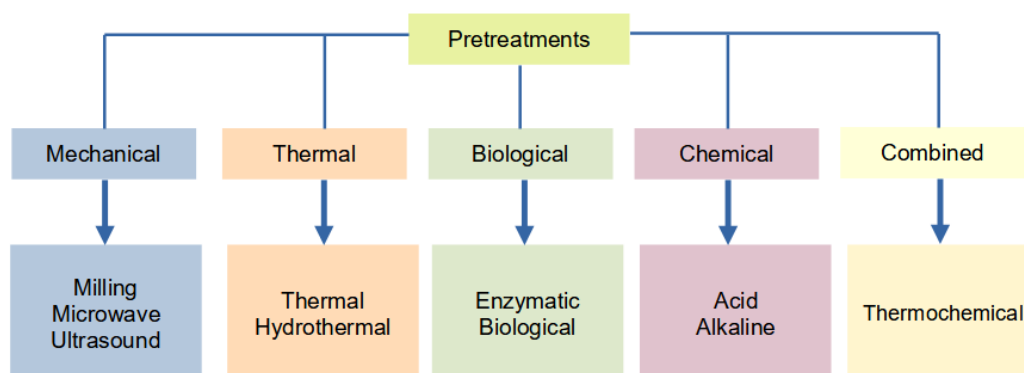
<b>Algae species</b>	<b>Anaerobic digestion process conditions</b>	<b>Methane yield (mL CH<sub>4</sub>/g VS)</b>	<b>Reference</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35 °C, 30 days	337	[41]
<i>Microcystis spp</i>		140	
<i>Nannochloropsis salina</i>		557	
<i>Nannochloropsis sp.</i>		357	
<i>Nanofrustulum sp.</i>		507	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		337	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35 °C, 29 days	156	[70]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35 °C, 25 days	229	[71]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch reactor, 35 °C, 30 days	139 <sup>a</sup>	[72]
<i>Hydrodictyon reticulatum</i> (filamentous algae)	Batch reactor, 35 °C, 25 days	170	[73]
<i>Microcystis spp.</i>	Batch reactor, 35 °C, 30 days	140	[74]
<i>Nannochloropsis salina</i>	Batch reactor, 35 °C, 19 days	430	[75]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Batch reactor, 33 °C, 30 days	270	[58]
<i>Scenedesmus obliquus</i>		130	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Batch reactor, 35 °C, 33 – 34 days	76 <sup>1</sup>	[76]
<i>Scenedesmus sp.</i>		82 <sup>1</sup>	
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	Batch reactor, 37°C, 15 days, pH 9 (previously adapted inoculum)	155	[44]
<i>Scenedesmus sp. and Chlorella spp.</i>	Batch reactor, 35 °C, 10 days	100 – 140	[24]

2 <sup>1</sup> mL CH<sub>4</sub>/g COD<sub>in</sub>. ADMFC = anaerobic digester with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. COD = chemical oxygen demand. DW = dry weight. OLR = organic  
3 loading rate. vs. = volatile solids.

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

#### 4. Algal biomass pretreatment methods

Rigid cell walls mean less available organic matter for the anaerobic microorganisms to convert, thus making the hydrolysis the limiting step of anaerobic digestion [79]. Growing interest in biofuels from microalgae and cyanobacteria has led to an increasing number of investigations about different pretreatment methods (Figure 1) to enhance methane yield from algal biomass [15,16,18,80].



11  
12  
13

**Figure 1.** The main algal biomass pretreatment methods aimed at methane production.

14

##### 4.1. Mechanical pretreatment

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

Mechanical pretreatment includes physical methods aimed at size reduction (milling) or cell wall disruption by provoking physical damage (ultrasound, microwave), the latter being more commonly used for microalgae biomass. Ultrasound pretreatment relies on the cavitation produced by soundwaves to break the cell wall from the inside out. Although it cannot break chemical bonds, microwave can break hydrogen bonds of the macromolecules, altering their structures and ultimately damaging the cell wall [81,82].

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

In general, higher specific power or longer exposition time favors ultrasound and microwave pretreatment, leading to higher biomass solubilization and methane yield than untreated biomass (Table 3). For some species, pretreatment only promotes the rupture of the cell wall, facilitating the access of microorganisms to the intracellular material. Although the solubilization degree may seem low, enough intracellular content is released to make a significant difference between methane yields of treated and untreated biomass [76]. In other cases, biogas production seems to be linked to the specific energy applied during the pretreatment and the degree of biomass solubilization [62]. However, physical pretreatments are inefficient from the energy perspective, since the energy generated from anaerobic digestion often does not offset the energy demanded for the pretreatment step [80,83].

36

##### 4.2. Thermal pretreatment

37  
38  
39  
40  
41  
42

In thermal pretreatment, biomass can be heated at temperatures  $\leq 100$  °C. When higher temperatures followed by pressure increase are applied, it is considered a hydrothermal pretreatment [82]. Both time and temperature influence biomass solubilization and, in some cases, temperature has more influence on thermal pretreatment, resulting in a positive correlation between biomass solubilization and methane yield

43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

(Table 3). On the one hand, high temperatures solubilize organic matter and partially hydrolyze macromolecules such as carbohydrates, lipids, and proteins. On the other hand, they may also favor the formation of inhibitory chemicals affecting the metabolism of anaerobic microorganisms, especially ammonia [84]. Hence, many authors noticed a decrease in biomass digestibility when the microalgae were treated with harsh temperature and pressure in comparison to those treated with milder conditions [70]. Many studies have demonstrated that to increase methane production from microalgae biomass, pretreatment temperatures should range between 55 and 170 °C [83,95].

54 **Table 3.** Physical, thermal, and biological methods of microalgae pretreatment aimed at methane production.

Code	Method	Species/Concentration	Pretreatment conditions	Solubilization increase (%)	Methane yield (NmL CH <sub>4</sub> /g VS)			Reference		
					Without PT	With PT	Variation (%)			
U1	Ultrasound	<i>Chlorella sorokiniana</i> , 13.8 g/L COD <sub>T</sub>	220 W, 30 min	28.5 <sup>b</sup>	317.66	458.43	44.3	[80]		
U2			400 W, 20 min	33.3 <sup>b</sup>					414.12	30.4
U3			400 W, 30 min	43.2 <sup>b</sup>					424.68	33.7
U4			400 W, 40 min	56.8 <sup>b</sup>					421.87	32.8
U5	Ultrasound	Mixed biomass ( <i>Monoraphidium</i> sp., <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., <i>Amphora</i> sp.)	60 W, 30 min	84.0 <sup>c</sup>	147.70	177.20	20.0	[83]		
U6			70 W, 30 min	91.0 <sup>c</sup>					196.40	33.0
U7	Ultrasound	<i>Scenedesmus</i> sp., 4.48 g/L TS	80 W, 30 min, 128.9 MJ/kg TS	8.0 <sup>a</sup>	81.80 <sup>j</sup>	153.50 <sup>j</sup>	87.7	[85]		
U8	Ultrasound	Mixed biomass ( <i>Nitzschia</i> sp., <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Monoraphidium</i> sp.), 31.49 g/L TS	70 W, 30 min, 20 kHz, 27 MJ/kg TS	9.5 <sup>c</sup>	105.6	113.7	8.0	[56]		
M1	Microwave		900 W, 3 min, 34.3 MJ/kg TS	9.8 <sup>c</sup>					127.70	21.0
M2	Microwave	Microalgae mixed biomass from high-rate ponds, 16.7 g/L COD <sub>T</sub>	300 W, 9 min, 64,400 kJ/kg TS	7.5 <sup>d</sup>	117.63	167.24	60.1	[62]		
M3			600 W, 4.5 min, 64,400 kJ/kg TS	7.4 <sup>d</sup>					188.34	71.6
M4			900 W, 3 min, 64,400 kJ/kg TS	8.1 <sup>d</sup>					210.06	78.6
M5	Microwave	Microalgae mixed biomass from high-rate ponds, 22.0 g/L COD <sub>T</sub>	900 W, 3 min, 70,000 kJ/kg VS	140.0 <sup>a</sup>	170.00	270.00	58.8	[83]		
T1	Thermal	<i>Chlorella sorokiniana</i> , 13.8 g/L COD <sub>T</sub>	80 °C, 20 min	6.6 <sup>b</sup>	317.66	374.81	18.0	[80]		
T2	Thermal	Microalgae mixed biomass from high-rate ponds, 17.9 g/L COD <sub>T</sub>	55 °C, 10 h	402.0 <sup>e</sup>	111.00	124.59	13.0	[86]		
T3			75 °C, 10 h	1058.0 <sup>e</sup>					154.57	40.0
T4			95 °C, 10 h	1184 <sup>e</sup>					169.88	53.0
T5	Thermal	<i>Scenedesmus</i> sp., 4.48 g/L TS	70 °C, 25 min	90.0 <sup>a</sup>	81.80 <sup>j</sup>	89.3 <sup>j</sup>	9.0	[85]		
T6			80 °C, 25 min	130.0 <sup>a</sup>					128.7 <sup>j</sup>	57.0
T7	Thermal	<i>Scenedesmus</i> sp., 14.0 g/L COD	70 °C, 180 min	na	76.00 <sup>j</sup>	85.00 <sup>j</sup>	11.8	[76]		
T8			90 °C, 180 min	na					170.00 <sup>j</sup>	123.7
T9	Thermal	<i>Chlorella</i> sp., 27.9 g/L COD	65 °C, 4h	41.0	211.00	297.00	41.0	[87]		

Code	Method	Species/Concentration	Pretreatment conditions	Solubilization increase (%)	Methane yield (NmL CH <sub>4</sub> /g VS)			Reference
					Without PT	With PT	Variation (%)	
T10	Hydrothermal	Microalgae mixed biomass from high-rate ponds, 2.5% TS	110 °C, 1.2 bar, 15 min	8.0 <sup>c</sup>	120.00	150.0	25.0	[88]
T11			110 °C, 1.2 bar, 30 min	8.8 <sup>c</sup>		140.00	17.0	
T12			130 °C, 1.7 bar, 15 min	15.0 <sup>c</sup>		170.00	42.0	
T13			130 °C, 1.7 bar, 30 min	13.3 <sup>c</sup>		160.00	33.0	
T14	Hydrothermal	<i>Chlorella vulgaris</i> , 32.1 g/L COD <sub>T</sub>	140 °C, 3 bar, 10 min, 350 rpm	42.0 <sup>f</sup>	156.40 <sup>j</sup>	219.80 <sup>j</sup>	40.0	[70]
T15			160 °C, 6 bar, 10 min, 350 rpm	54.0 <sup>f</sup>		256.30 <sup>j</sup>	64.0	
T16			180 °C, 10 bar, 10 min, 350 rpm	69.0 <sup>f</sup>		226.50 <sup>j</sup>	45.0	
T17	Hydrothermal	<i>Scenedesmus obliquus</i> , 20 g/L TS	165 °C, 7 bar, 30 min	40.0 <sup>g</sup>	159.00	383.60	141.3	[89]
T18	Hydrothermal (solar powered)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , 0.961 g TS/g DW	155 °C, 30 min, flow rate 40 L/h (semi-continuous)	na	221.70	348.00	57.0	[90]
E1	Enzymatic	<i>Scenedesmus obliquus</i> , 25 mg sCOD/g TS	Cellulase + endogalactouronase mix, 17.5 U/g TS, 50 °C, 24 h	organic matter solubilization between 35.0 and 45.0% <sup>g</sup>	159.00	897.75	464.6	[89]
E2		<i>Scenedesmus obliquus</i> , 25 mg sCOD/g TS	Estearase + protease mix, 12.5 U/g TS, 50 °C, 24 h		159.00	617.70	288.5	
E3		<i>Chlorella sorokiniana</i> , 95 mg sCOD/g TS	Cellulase + endogalactouronase mix, 17.5 U/g TS, 50 °C, 24 h		169.30	532.68	214.6	
E4		<i>Chlorella sorokiniana</i> , 95 mg sCOD/g TS	Estearase + protease mix, 7.5 U/g TS, 50 °C, 24 h		169.30	486.08	187.1	
E5		<i>Arthrospira máxima</i> , 300 mg sCOD/g TS	Cellulase + endogalactouronase mix, 12.5 U/g TS, 50 °C, 24 h		111.00	879.60	689.7	
E6		<i>Arthrospira máxima</i> , 300 mg sCOD/g TS	Estearase + protease mix, 7.5 U/g TS, 50 °C, 24 h		111.00	927.00	735.1	
E7		<i>Porphyridium cruentum</i> , 3.4 g COD <sub>T</sub> /L	Protease 0.5 mL/g dry biomass, pH 8.0 – 8.5, 55 °C, 9 h		32.2 <sup>h</sup>	130.00	230.00	

Code	Method	Species/Concentration	Pretreatment conditions	Solubilization increase (%)	Methane yield (NmL CH <sub>4</sub> /g VS)			Reference
					Without PT	With PT	Variation (%)	
E8			Enzyme commercial cocktail, 1% E/S, pH 4.8, 24 h	42.0 <sup>i</sup>		430.80	35.6	
E9			Enzyme commercial cocktail 1% E/S, pH 4.8, 24 h	48.0 <sup>i</sup>		440.70	38.7	
E10	Enzymatic	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Commercial cellulase, 1% E/S, pH 4.8, 24 h	36.0 <sup>i</sup>	317.66	552.66	74.0	[92]
E11			Commercial cellulase, 1% E/S, pH 7.0, 24 h	34.0 <sup>i</sup>		545.68	71.0	
E12			Enzyme commercial cocktail, 1% E/S, pH 7.0, 24 h	50.0 <sup>i</sup>		570.84	70.0	
E13	Biological	Mixed culture of bacteria and microalgae, composed mainly by <i>Oocystis</i> sp., 31.3 g/L COD <sub>T</sub>	100 U/L laccase-rich broth from <i>Trametes versicolor</i> , 100 rpm/20 min	na	83.0	144.00	20.0	[93]
E14			100 U/L commercial laccase, 20 min, 100 rpm, 25 °C			100.00	74.0	
E15	Biological	<i>Scenedesmus</i> sp., 60.9 g/L COD <sub>T</sub>	TSAD, rumen m-orgs as pretreatment in the 1 <sup>st</sup> stage, fermentation reactor: 40 d, SRT = 7 d, HRT = 7 d.	na	na	214.00	na	[94]

55 <sup>a</sup> S (%) = (sCOD<sub>f</sub>\*100)/(COD<sub>0</sub>) [sCOD= soluble COD, 0 = before pretreatment, f= after pretreatment].

56 <sup>b</sup> S (%) = (VSS<sub>f</sub>\*100)/(VSS<sub>0</sub>) [VSS = volatile suspended solids, 0 = before pretreatment, f= after pretreatment].

57 <sup>c</sup> S (%) = [(sVS<sub>f</sub> - sVS<sub>0</sub>)/(VS - sVS<sub>0</sub>)]\*100 [sVS = soluble volatile solids, vs. = total volatile solids, 0 = before pretreatment, f= after pretreatment].

58 <sup>d</sup> S (%) = (sVS<sub>f</sub>/VS) [sVS = soluble volatile solids, vs. = total volatile solids, f= after pretreatment].

59 <sup>e</sup> S (%) = {[(sVS<sub>f</sub>/VS) - (sVS<sub>0</sub>/VS)]/(sVS<sub>0</sub>/VS)}\*100 [sVS = soluble volatile solids, vs. = total volatile solids, 0 = before pretreatment, f= after pretreatment].

60 <sup>f</sup> considering soluble carbohydrates.

61 <sup>g</sup> considering sCOD/g TS ratio.

62 <sup>h</sup> considering sCOD/g dry biomass ratio.

63 <sup>i</sup> S (%) = [(sVSS<sub>f</sub> - VSS<sub>0</sub>)/VSS<sub>0</sub>]\*100 [ sVSS = soluble volatile suspended solids, 0 = before pretreatment, f= after pretreatment].

64 <sup>j</sup> NmL CH<sub>4</sub>/g COD.

65 na = not available, E/S = enzyme/substrate, TSAD = two-stage anaerobic digestion.

66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115

#### 4.3. Biological pretreatment

Biological pretreatment can be performed by adding enzymes or hydrolytic microorganisms (e.g., bacteria and fungi) to the biomass under controlled temperature and pH conditions (Table 3). Cellulases are often used for pretreating species whose cell wall is composed of cellulose and hemicellulose, e.g., *Chlorella* sp. and *Chlorococcum* sp. [81]. Biological pretreatment does not release chemicals that are toxic or inhibitory for the anaerobic digestion microorganisms, which is an advantage over other pretreatment methods, such as thermal or chemical. However, it requires long times, the enzymes are specific to a substrate, and the cost of enzyme production is still high [96]. The choice of an enzyme must consider the chemical composition of the microalgae and of its cell wall, requiring investigation about which enzyme or mix of enzymes is most suitable for a given microalgae species [7,96].

Biological pretreatment using enzymes generated locally, e.g., using a fungal broth, can be more efficient in improving methane yield than using single commercial enzymes. This is due to a synergistic effect between multiple enzymes secreted by the fungi and enzymes secreted by the hydrolytic bacteria that participate in anaerobic digestion [92,93].

Some authors consider the first stage (acidogenic phase) of two-stage anaerobic digestion as a form of biological pretreatment, since it is dominated by fermentative bacteria digesting the organic matter [97]. The fermentation step can be aided by adding external enzymes or hydrolytic microorganisms [94].

#### 4.4. Chemical pretreatment

Chemical pretreatment can be performed by adding an alkali, acid, or oxidizing agent (Table 4) over the biomass. The solubilization of cell wall components and intracellular organic matter (carbohydrates, lipids, and proteins) by chemical pretreatment has been extensively investigated, and the main factors affecting this pretreatment method are chemical concentration, biomass concentration, temperature, and time [52,98]. The relationship between those factors and biomass solubilization is discussed in section 4.4.3.

Overall, the advantages of chemical pretreatment include high solubilization degree and low-energy demand. Disadvantages include the cost of chemicals, pH imbalance, inhibition of the methanogenic microorganisms due to buildup of toxic ions and molecules released during pretreatment, and corrosion of the reactors [82,99].

##### 4.4.1. Acid pretreatment

Acid pretreatment or acid hydrolysis is widely used for lignocellulosic biomass due to its efficiency in depolymerization of cellulose and hemicellulose, converting them into lower molecular weight sugars [97]. When pretreatment is performed using concentrated acid and/or high temperatures, the acid can react with solubilized sugars producing furfural and 5-hydroxymethylfurfural [96,100]. According to Ghasimi et al. [101], microbial growth and methanogenic activity during anaerobic digestion (mesophilic and thermophilic) are inhibited starting at 2 g/L of furfural or 5-hydroxymethylfurfural. Acid hydrolysis can use either concentrated or diluted acids. Concentrated acid leads to more efficient carbohydrate solubilization, formation of toxic by-products, and



116  
117

equipment corrosion, thus demanding more resistant construction materials [82].

118  
119  
120  
121

#### 4.4.2. . Alkaline pretreatment

Solubilization of organic matter by alkali addition (alkaline hydrolysis) occurs due to many reactions between the alkaline reagent and biomass components. In this process,

122 **Table 4.** Chemical and thermochemical pretreatments of algal biomass for methane production.

Code	Species/Concentration	Pretreatment conditions	Solubilization <sup>a</sup>		Methane yield (NmL CH <sub>4</sub> /g VS)			References		
			S <sub>r</sub> (%)	Variation (%)	Without PT	With PT	Variation <sup>b</sup> (%)			
A1	<i>Scenedesmus</i> sp., 6 g/L COD <sub>T</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1% v/v, 150 °C, 1 h	37.5	35.5	130.90	253.10	93.4	[102]		
A2		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.2% v/v, 150 °C, 1 h	36.9	34.6		na	na			
A3		Bubbling CO <sub>2</sub> up to pH 2, 150 °C, 1 h	41.6	39.6		na	na			
A4	<i>Spirulina maxima</i> , 55.7 g/L COD <sub>T</sub>	HCl, pH 1, 50 °C, 1 h	53.9	87.5	190.00	0.0	-100.0	[103]		
A5		HCl, pH 1, 100 °C, 1 h	57.4	100.0		60.0	-68.4			
A6		HCl, pH 1, 150 °C, 1 h	68.2	137.5		20.0	-89.5			
A7		HCl, pH 3, 50 °C, 1 h	39.5	37.5		110.0	-42.1			
A8		HCl, pH 3, 100 °C, 1 h	44.9	56.3		140.0	-26.3			
A9		HCl, pH 3, 150 °C, 1 h	64.6	125.0		160.0	-15.8			
A10		Microalgae biomass after lipid extraction, 10 g/L COD <sub>T</sub>	HCl, pH 5, room temp.	4.5	15.4	104.00 <sup>c</sup>	123.0 <sup>c</sup>		18.3	[104]
A11			HCl, pH 4, room temp.	7.2	84.6		107.0 <sup>c</sup>		2.9	
A12			HCl, pH 3, room temp.	10.8	176.9		124.0 <sup>c</sup>		19.2	
A13	HCl, pH 2, room temp.		18.2	366.7		174.0 <sup>c</sup>	67.3			
A14		HCl, pH 1, room temp.	24.3	523.1		217.0 <sup>c</sup>	108.7			
A15	Mixed biomass of <i>Chlorella</i> sp. and <i>Monoraphidium</i> sp., 14.45 g/L TS	HCl 0.05% m/m, pH 1, 80 °C, 2 h	na	964.0 <sup>d</sup>	78.13	142.50	82.4	[99]		
A16		HCl 1.25% m/m, pH 0.6, 80 °C, 2 h	na	1008.0 <sup>d</sup>		94.59	21.1			
A17		HCl 2.0% m/m, pH 0.4, 80 °C, 2 h	na	965.8 <sup>d</sup>		89.05	14.0			
A18	<i>Isochrysis galbana</i> , 4.5 g/L COD <sub>T</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.2% v/v, 40 °C, 16 h	8.4	27.1	9.27	15.90	71.5	[105]		
A19	<i>Chlorella vulgaris</i> , 26.2 g/L COD <sub>T</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2, room temp.	na	na	138.00	113.10	-18.6	[72]		
A20		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2, 120 °C, 20 min	na	500 <sup>e</sup>		221.80	59.7			
A21		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2, 120 °C, 40 min	na	700 <sup>e</sup>		228.80	64.7			
A22	Microalgae biomass from stabilization pond, 2% VS	HCl, pH 2, room temp., 1 h	na	na	14.00	46.00	228.6	[106]		
A23	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> , 32.2 g/L COD <sub>T</sub>	HCl 3% m/m, 105 °C, 1.7 h	60.0	821.4	234.00	296.00	26.5	[107]		
A24	<i>Oscillatoria tenuis</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M, pH 2; room temp.	11.0	143.0	191.00	210.00	9.9	[108]		

Code	Species/Concentration	Pretreatment conditions	Solubilization <sup>a</sup>		Methane yield (NmL CH <sub>4</sub> /g VS)			References
			S <sub>f</sub> (%)	Variation (%)	Without PT	With PT	Variation <sup>b</sup> (%)	
A25	Mixed biomass of <i>Desmodemus opoliensis</i> (47%),	HCl 0.5 M, pH 0.3, 121 °C, 1 h	40.0	135.3	216.00	205.20	-5.0	[109]
A26	<i>Navicula reichardtiana</i> (27%), <i>Tetrademus obliquus</i> (12%), <i>Scenedesmus</i> sp. (9%), and <i>Scenedesmus acuminatus</i> (5%), 74.5% VS	HCl 2.0 M, pH 0.3, 121 °C, 1 h	19.0	217.6	208.00	250.00	20.0	
B4	<i>Spirulina maxima</i> , 55.7 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH, pH 11, 50 °C, 1 h	50.0	75.0	190.00	210.00	10.5	[103]
B5		NaOH, pH 11, 100 °C, 1 h	60.0	106.3		220.00	15.8	
B6		NaOH, pH 11, 150 °C, 1 h	60.0	112.5		240.00	26.3	
B7		NaOH, pH 13, 50 °C, 1 h	55.0	100.0		90.00	-52.6	
B8		NaOH, pH 13, 100 °C, 1 h	70.0	137.5		140.00	-26.3	
B9		NaOH, pH 13, 150 °C, 1 h	78.0	162.5		80.00	-57.9	
B10	Mixed biomass,	NaOH 5 g/L, pH 10, room temp.	63.0	219.0	66.30 <sup>c</sup>	195.00 <sup>c</sup>	194.1	[110]
B11	56.2 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 12, room temp.	75.4	281.8		19.50 <sup>c</sup>	-70.6	
B12		NaOH 5 g/L, pH 10, 140 °C, 30 min	80.0	305.1		226.20 <sup>c</sup>	241.2	
B13		NaOH 20 g/L, pH 10, 140 °C, 30 min	85.1	330.4		12.48 <sup>c</sup>	-81.2	
B14	<i>Chlorella</i> sp., 45.6 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 13.7 g/L, pH 13, room temp.	20.0	10.0	na	na	-10.0 <sup>f</sup>	[7]
B15	<i>Nannochloropsis</i> sp., 51 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 10.8 g/L, pH 14, room temp.	30.0	20.0			-30.0 <sup>f</sup>	
B16	<i>T. weissflogii</i> , 46.1 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 13, room temp.	60.0	-1.2			20.0 <sup>f</sup>	
B17	<i>Tetraselmis</i> sp., 42.2 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 7.8 g/L, pH 13, room temp.	60.0	38.2			10.0 <sup>f</sup>	
B18	<i>Tetraselmis</i> sp., 42.2 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 14, room temp.	70.0	80.9			5.0 <sup>f</sup>	
B19	<i>Pavlova_cp</i> sp., 56.1 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 13.7 g/L, pH 12.5, room temp.	70.0	10.0			-20.0 <sup>f</sup>	
B20	<i>Chlorella</i> sp., 45.6 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 13, 120 °C, 30 min	80.0	488.4			30.0 <sup>f</sup>	
B21	<i>Nannochloropsis</i> , 51 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 14, 120 °C, 30 min	95.0	285.7			40.0 <sup>f</sup>	
B22	<i>T. weissflogii</i> , 46 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 12, 120 °C, 30 min	60.0	-1.2			15.0 <sup>f</sup>	
B23	<i>Tetraselmis</i> sp., 42.2 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 6 g/L, pH 13, 120 °C, 30 min	90.0	126.1			5.0 <sup>f</sup>	
B24	<i>Pavlova_cp</i> sp., 56.1 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 20 g/L, pH 13, 120 °C, 30 min	90.0	53.5			5.0 <sup>f</sup>	
B25	<i>Chlorella</i> sp. (30%) and	NaOH, pH 9, room temp.	5.4	84.8	336.00	363.00	8.0	[111]
B26	<i>Scenedesmus</i> sp. (70%),	NaOH, pH 11, room temp.	5.0	78.1		327.00	-2.7	
B27	12.3 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH, pH 13, room temp.	20.6	324.5		213.00	-36.6	
B28	<i>Nannochloropsis salina</i> , 97% TS	NaOH, pH 11, room temp.	na	-		no CH <sub>4</sub> in biogas		[112]
B29	<i>Spirulina platensis</i> , 60.4 g/L COD <sub>T</sub>	NaOH 0.8 g/L, room temp., 12 h	55.0	55.5	278.80	289.90	4.0	[113]
B30		NaOH 1.6 g/L, room temp., 12 h	57.0	56.7		297.50	6.7	
B31		NaOH 4.0 g/L, room temp., 12 h	20.0	20.4		294.90	5.8	
B32	Mixed biomass of <i>Chlorella</i> and	CaO 4% m/m, pH 12, room temp., 4 d	10.0	400.0	260.00	282.00	8.5	[42]
B33	<i>Scenedesmus</i> , 23.5 g/L COD <sub>T</sub>	CaO 4% m/m, pH 12; 55 °C, 24 h	10.0	400.0		255.00	-1.9	
B34		CaO 4% m/m, pH 12, 72 °C, 24 h	15.0	650.0		287.00	10.4	

Code	Species/Concentration	Pretreatment conditions	Solubilization <sup>a</sup>		Methane yield (NmL CH <sub>4</sub> /g VS)			References
			S <sub>f</sub> (%)	Variation (%)	Without PT	With PT	Variation <sup>b</sup> (%)	
B35		CaO 10% m/m, pH 12, room temp., 4 d	13.0	550.0		259.00	-0.4	
B36		CaO 10% m/m, pH 12, 55 °C, 24 h	20.0	900.0		292.00	12.3	
B37		CaO 10% m/m, pH 12, 72 °C, 24 h	25.0	1150.0		325.00	25.0	
B38	<i>Chlorella</i> sp.	NaOH 0.05%, 50 °C, 24 h	15.8	139.4	137.17	110.00 <sup>c</sup>	-19.8	[61]
B39		NaOH 2.0%, 50 °C, 24 h	16.2	145.5		125.00 <sup>c</sup>	-8.9	
B40		NaOH 5.0%, 50 °C, 24 h	18.2	175.8		155.00 <sup>c</sup>	13.0	
B41		NaOH 0.05%, 50 °C, 48 h	15.8	139.4		130.00 <sup>c</sup>	-5.2	
B42		NaOH 2.0%, 50 °C, 48 h	17.6	166.7		160.00 <sup>c</sup>	16.6	
B43	<i>Scenedesmus</i> sp.	NaOH 5.0%, 50 °C, 48 h	19.8	200.0		135.00 <sup>c</sup>	-1.6	
B44		NaOH 0.05%, 50 °C, 24 h	4.1	115.8	135.00 <sup>c</sup>	150.00 <sup>c</sup>	11.1	[61]
B45		NaOH 2.0%, 50 °C, 24 h	5.1	168.4		165.00 <sup>c</sup>	22.2	
B46		NaOH 5.0%, 50 °C, 24 h	16.8	784.2		162.00 <sup>c</sup>	20 <sup>f</sup>	
B47		NaOH 0.05%, 50 °C, 48 h	4.7	147.4		146.00 <sup>c</sup>	8.2	
B48		NaOH 2.0%, 50 °C, 48 h	7.8	310.5		140.00 <sup>c</sup>	3.7	
B49		NaOH 5.0%, 50 °C, 48 h	17.7	669.6		138.00 <sup>c</sup>	2.2	
B50	Mixed biomass of <i>Chlorella</i> sp. and <i>Monoraphidium</i> sp., 14.45 g/L COD <sub>T</sub>	KOH 0.5%; pH 12.6, 80 °C, 2 h	na	1943.5 <sup>d</sup>	78.13	145.10	86.0	[99]
B51		KOH 1.25%; pH 12.6, 80 °C, 2 h	na	2043.5 <sup>d</sup>		100.14	28.0	
B52		KOH 2.0%; pH 12.6, 80 °C, 2 h	na	2184.7 <sup>d</sup>		80.78	3.4	
B53	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> , 94.29 g TS/L	2% w/w biomass/alkaline H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution	15.4	100.0 <sup>a</sup>	155.00	208.40	34.5	[44]
B54		(1.25% v/v), 50 °C, 1.5 h NaOH 4.0 M, pH 10, 120 °C, 20 min	27.0	251.0 <sup>a</sup>		227.10	46.5	

123 <sup>a</sup> calculated for this study: S<sub>0</sub> and S<sub>f</sub> = solubilization degree before and after pretreatment. S<sub>0</sub> (%) = (sCOD<sub>0</sub>/(COD<sub>T0</sub>))\*100; S<sub>f</sub> (%) = (sCOD<sub>f</sub>/(COD<sub>Tf</sub>))\*100; COD<sub>T</sub> = total COD (g/L); sCOD<sub>0</sub> =

124 soluble COD (g/L) before pretreatment; sCOD<sub>f</sub> = soluble COD (g/L) after pretreatment; Solubilization increase (%) = [(S<sub>0</sub>/S<sub>f</sub>) - 1]\*100

125 <sup>b</sup> Methane yield increase (%) = [(Y<sub>CH<sub>4</sub>-PT</sub>/Y<sub>CH<sub>4</sub>-B</sub>)-1]\*100 Y<sub>CH<sub>4</sub>-B</sub> = methane yield of untreated biomass, Y<sub>CH<sub>4</sub>-PT</sub> = methane yield of treated biomass

126 <sup>c</sup> NmL CH<sub>4</sub>/g COD

127 <sup>d</sup> considering total organic carbon (TOC) increase (%) after pretreatment

128 <sup>e</sup> considering soluble carbohydrates

129 <sup>f</sup> as informed by the original paper na = not available

saponification of uronic acids and esters occur, as well as reactions involving carboxylic groups and neutralization of acid intermediaries [110]. Alkalis increase the biomass superficial area by swelling after saponification reactions [42,114], favoring the attack of the digesting microorganisms [61] and protein solubilization [52,72]. Biomass solubilization achieves better results when monovalent alkalis are used instead of divalent ones, since divalent alkalis ionize only partially in aqueous media [110].

#### 4.4.3. Factors influencing algal biomass solubilization in chemical and thermochemical pretreatments

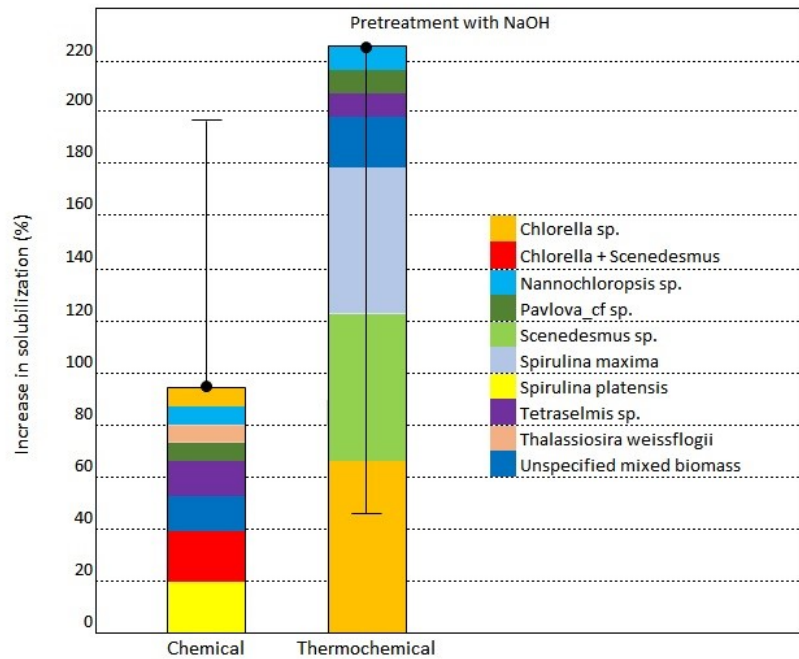
- Temperature

Both acid and alkaline pretreatment have been less explored at room temperature, with most studies using temperatures ranging from around 50 to 100 °C and greater (Table 4). The combination of temperature plus an acid or alkali allows pretreatments to occur under mild conditions, demanding less time and energy, which potentially lowers pretreatment costs. Such combination leads to biomass solubilization greater than the ones achieved by chemical pretreatment at room temperature or even by thermal pretreatment alone [7,42,70,110].

Figure 2 shows the increase in biomass solubilization after chemical or thermochemical pretreatment using NaOH compared to the solubilization of untreated biomass. The dot and whisker represent the mean and standard deviation of the solubilization increase obtained in several studies conducted with the species highlighted in the legend. To construct the figure, results from references [7,110,111,113] and [7,61,103,110], shown in Table 4, were used for chemical and thermochemical pretreatments with NaOH. The colors in the two columns represent the contribution share of the different microalgae species in calculating the mean and standard deviation. Thus, in the 14 chemical pretreatment studies, the most studied biomasses were *Spirulina platensis* (21.4% of the total) and a mixture of *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. (21.4%), followed by the biomasses of *Tetraselmis* sp. (14.3%) and unspecified mixed biomass (14.3%). While in the 24 thermochemical pretreatment studies, *Chlorella* sp. (29.2%), *Scenedesmus* sp. (25%), and *Spirulina maxima* (25%) were the most studied biomasses.

The increase in solubilization in the chemical pretreatment ranged from -1.2% (*Thalassiosira weissflogii*) to 325% (unspecified mixed biomass), with an average of 91.3±105.4 %. At the same time, the increase in solubilization in the thermochemical pretreatment ranged from 53.5% (*Pavlova cf* sp.) to 784.2% (*Scenedesmus* sp.), with an average of 226.9±183.3 %. The wide ranges of values are due to the different characteristics of the studied biomasses. The lowest values occur when the biomass contains species without a cell wall or a simple cell wall. In these cases, the alkaline pretreatment at room temperature becomes irrelevant to biomass solubilization. In contrast, the highest values are from biomasses containing species with a more rigid cell wall and a more significant alkaline pretreatment contribution to solubilization. The mean solubilization increase achieved at higher temperatures (thermochemical pretreatment) is 2.5-fold greater than the mean increase obtained by chemical pretreatment at room temperature. The difference between the averages is statistically significant (p-value of 0.006 in Student's t-test with a 95% confidence interval).

Although pretreatments at higher temperatures lead to high solubilization, the hydrolysis of lipids and proteins in such conditions may form long chain fatty acids (LCFA) and ammonia, both inhibitors of the methanogenic metabolism [84]. Higher temperatures also favor the formation of Maillard reactions between proteins, amino acids, and reducing sugars, thereby generating new complex molecules in the soluble phase. The presence of inhibitory and recalcitrant substances explains the lower digestibility of biomass treated under high temperatures, signaling the need to prioritize thermal pretreatments at mild temperatures [42].



**Figure 2.** Mean and standard deviation for solubilization increase of different microalgae species after chemical and thermochemical pretreatment with NaOH. The colors in the two columns represent the contribution share of the different microalgae species in calculating the mean and standard deviation. Data from references [7,61,103,110,111,113].

- Time reaction

High temperatures are beneficial for organic matter solubilization and reduce pretreatment time compared to pretreatment at room temperature. Usually, temperatures greater than 100 °C led to satisfactory solubilization degrees within 20 min to 2 h (Table 4). Different microalgae species reached solubilizations ranging from 60 to 95% after 30 min of hydrolysis with NaOH (6-20 g/L) at 120°C [7]. At mild temperatures, the pretreatment time seems to have little influence on the solubilization results. For instance, mixed biomass composed of *Chlorella* and *Scenedesmus* demanded 4 days of pretreatment with 10% w/w CaO to achieve a solubilization degree of 13%, while 25% was achieved after 24h of pretreatment at 72°C [42]. Pretreatment of *Chlorella* and *Scenedesmus* by applying 5% w/w NaOH at 50 °C led to similar solubilization results of 18.2 and 16.2%, respectively, after 24 h, and of 19.8 and 17.7% after 48 h, respectively [61].

- Chemicals concentration

Regardless of the acid or alkali used in the pretreatment, some authors noticed that biomass solubilization increases only to a certain level, at which it either remains the same or decreases even when more concentrated chemicals are used. Penaud et al. [110] studied the alkaline pretreatment of a mixed algal biomass at room temperature with different NaOH concentrations. When the alkali concentration was increased from 4.6 to 26.1 g/L, the biomass solubilization increased from 63 to 75.4%. Pretreatment of *Spirulina platensis* using 0.8 and 1.6 g/L NaOH performed by Du et al. [113] reached a final solubilization degree of 61% in both cases, corresponding to a 56% increase over untreated biomass. With 4.0 g/L NaOH, however, the degree of biomass solubilization remained identical to that of untreated biomass.

Similar solubilization results were achieved by acid pretreatment of *Scenedesmus* using 0.1 and 0.2% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [102]. Acid pretreatments of a mixed biomass containing *Chlorella* and *Monoraphidium* sp. with HCl concentrations ranging from 0.5 to 2.0% w/w resulted in increasing concentration of soluble sugars (glucose, xylose, arabinose) with the increase in HCl concentration [99]. Juárez et al. [109] investigated the thermochemical pretreatment of a mixed microalgae biomass (47% *Desmodesmus opoliensis*, 27% *Navicula reichardtiana*, 12% *Tetradesmus obliquus*, 9% *Scenedesmus* sp. and 5% *Scenedesmus acuminatus*) at 121°C with HCl for one hour. By increasing HCl concentration from 0.5 to 2.0 mol/L, the volatile solids concentration in the solid fraction of the hydrolyzed biomass decreased from 40 to 19%.

- pH

Using solutions with different NaOH concentrations, but the same pH (12), Penaud et al. [110] obtained very similar solubilization results, meaning that pH plays an important role in alkaline pretreatment. Moreover, pH seems to be beneficial to biomass solubilization as it approaches high levels of acidity or alkalinity. Cho et al. [111] assessed the pretreatment of a mixed algal biomass (*Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp.) using NaOH at room temperature. Solubilization degree reached around 5.0% after pretreatments at pH 9 and 11, whereas at pH 13, a final solubilization of 25% was obtained. Passos et al. [99] investigated the pretreatment of a mixed biomass of *Chlorella* and *Monoraphidium* sp. at 80 °C for 2h, with HCl at three different pHs (1, 0.6, and 0.4). Their results showed that pH 0.6 led to the highest biomass solubilization.

- Cell wall composition

Bohutsky et al. [7] evaluated the chemical and thermochemical pretreatment of five microalgae species: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp., both species with rigid cell walls; *Thalassiosira weissflogii*, with a silica cell wall; *Tetraselmis* sp., with a cell wall composed of glycoproteins; and *Pavlova\_cf* sp., which does not have a cell wall. All five species were treated at room temperature with NaOH concentrations up to 20 g/L. Biomass solubilization increased by of 10 to 20% for *Chlorella* and *Nannochloropsis* sp. when 10.8 and 13.7 g/L NaOH was used. Such low solubilization increase was probably due to the complex cell walls of such species, making it harder for the alkali alone to depolymerize its constituents. Solubilization of *Tetraselmis* sp. doubled after pretreatment at room temperature using 20g/L NaOH, while for the other species solubilization remained close to that of untreated biomass. In the case of species that lack cell walls (e.g., *Pavlova\_cf*) or have a simple cell wall (e.g., *Thalassiosira weissflogii*), organic matter is readily available, making alkali pretreatment at room temperature irrelevant to biomass solubilization.

Thermochemical pretreatment, in turn, enhanced the solubilization of four of the five species. *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. reached solubilization degrees of 80 and 95%, respectively, after pretreatment at 121 °C during 30 min with 20 g/L NaOH.

- Algal biomass concentration

There is a consensus that a concentration step before anaerobic digestion of algal biomass (thus, before pretreatment as well) is crucial for a good performance of the anaerobic reactor. Overall, microalgae concentration in culture media is low, regardless of the cultivation method (open ponds or closed photobioreactors), meaning that only a small portion of the influent is actual organic matter available to be digested [115]. Furthermore, depending on the operational conditions of the anaerobic digester, processing a large volume of liquid may washout the anaerobic microorganisms [116]. Most lab-scale experiments reported in the scientific literature use centrifugation for harvesting and concentration of the microalgal biomass. Nevertheless, in pilot-scale and large-scale, less energy-intensive, and more economic methods must be chosen [115]. Nevertheless, only a few studies have investigated the synergistic effect between algal biomass concentration methods and pretreatment prior to anaerobic digestion.

Although concentrated biomass is better for anaerobic digestion, different works show different trends for algal biomass concentration and solubilization. Alzate et al. [116] studied the anaerobic digestion of three different microalgae mixtures (A, B, and C) using three different concentrations of each. According to them, when the biomass concentration decreased from 10 to 3 g TS/kg, methane yields decreased for all three mixtures. On the other hand, increasing biomass concentration from 10 to 20 g TS/kg decreased the methane yield for mixture A, but had the opposite effect for microalgae mixtures B and C. In the work of Santos et al. [105], biomass concentration was the most significant factor ( $p = 0.05$ ) influencing solubilization. Thus, higher methane production was obtained by the anaerobic digestion of *I. galbana* at the maximum concentration (4500 mg COD/L) after thermochemical pretreatment with dilute acid. The statistical model presented by Rincón-Pérez et al. [107] showed that biomass concentration would have a negative effect on solubilization. However, the highest methane yield (296 mL CH<sub>4</sub>/g VS<sub>in</sub>) was achieved when the maximum microalgae concentration was used for anaerobic digestion (30 g TS/L).

#### 4.4.4. Influence of chemical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of algal biomass

- Solubilization

Overall, methane yield increases as the organic matter available for anaerobic digestion increases. Table 4 presents some examples of improved methane yield after anaerobic digestion of chemically and thermochemically treated algal biomass [99,102,104,105]. Following this trend, higher solubilizations should lead to higher methane yields. However, the relationship between the algal biomass solubilization and methane production is not well defined. Results reported in the literature show that for both chemical pretreatment at room temperature and thermochemical, methane yields seldom follow biomass solubilization trends, especially under harsh pretreatment conditions [7,103].

The less soluble the organic matter is, the lower the expected methane conversion is. However, after severe pretreatment (e.g., high



chemical concentration), hydrolysis is not the limiting step anymore. Thus, low methane yields from treated biomass can be ascribed to the formation of complex molecules in the soluble phase via Maillard reactions. High temperatures and extreme pH contribute to Maillard reactions, forming recalcitrant substances [42,110] that decrease overall biodegradability and methane yields, even though more organic matter is available after pretreatment. Inhibition due to sodium buildup was ruled out as the cause of low methane yields in the experiments of Penaud et al. [110], because the lack of correlation between solubilization and methane yield was also observed for biomass pretreated with KOH, Mg(OH)<sub>2</sub>, and Ca(OH)<sub>2</sub>. In conclusion, often the pretreatment conditions that result in higher solubilizations are not the same that lead to the highest methane yield [61,99,111].

- Ammonia accumulation

Microalgae and cyanobacteria are known for their high protein content. In the first stage of anaerobic digestion, hydrolytic bacteria secrete enzymes that hydrolyze proteins into amino acids, generating free ammonia and favoring a low C/N ratio [7,118]. The same happens with chemical pretreatment due to the reactions between proteins and the chemical reagent, especially with alkalis promoting protein degradation [52].

Ammonia may inhibit anaerobic digestion for various reasons. For instance, it permeates easily through the cell membrane, changing the intracellular pH. Free ammonia buildup can also inhibit specific enzymes involved in methane production [118,119]. Traditionally, N-NH<sub>3</sub> concentrations are considered inhibitory between 1,500 and 3,000 mg/L to methanogenic microorganisms at pH values higher than neutral, while concentrations over 3,000 mg N-NH<sub>3</sub>/L are toxic to methanogenic microorganisms regardless of pH [120]. However, recent studies have reported inhibition occurring at N-NH<sub>3</sub> concentrations ranging from 1,500 to 10,000 mg/L for mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of a variety of substrates [121,122].

- Fatty acid accumulation

During anaerobic digestion, lipids are first hydrolyzed into long chain fatty acids (LCFAs) by fermentative hydrolytic bacteria. Then, the acidogenic bacteria convert them into volatile fatty acids (VFAs), such as acetic, propanoic, and butanoic acids. In turn, VFAs are consumed by the acetogenic bacteria. Although they are not toxic to the methanogenic metabolism, accumulation of VFAs is a signal of imbalance and may acidify the reactor lowering methane production. Long chain fatty acids adsorb into the cell wall or cell membrane of Gram-negative bacteria, causing transport issues and slowing down bacterial activity [123]. At high concentrations, LCFAs inhibit both their degradation by acetogenic bacteria and the degradation of VFAs by methanogenic archaea. The higher the concentration of LCFAs in the reactor, the longer the lag phase before methane production starts and the lower the biogas production [112,124].

LCFA accumulation was observed in the anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* after alkaline pretreatment at pH 11, resulting in low concentrations of VFAs and a biogas without any methane. According to the authors, under alkaline conditions, there are insufficient protons for the  $\beta$ -oxidation reaction performed by acetogenic organisms during the degradation of fatty acids. In addition, the high pH also strongly inhibit

the growth of acetogenic and methanogenic organisms, suppressing the subsequent steps of anaerobic digestion [112].

- Salt accumulation

Inorganic salts are essential for microbial growth and cell metabolism. However, high or even moderate salt concentration can be toxic or inhibitory [99,125]. Alkaline reagents used in chemical and thermochemical pretreatments or as pH neutralizers after acid pretreatments favor the accumulation of Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> ions in the biomass. In addition, because salts adhere to the biomass surface, marine and halotolerant species often present higher salinity [116].

Sodium concentrations greater than 3 g/L are highly toxic to methanogenic microorganisms, while K<sup>+</sup> concentrations between 2.5 and 4.5 g/L cause moderate inhibition and strong inhibition above 12 g/L [99]. Toxicity from salt accumulation could hamper biogas productivity when high alkali concentrations are used to achieve high biomass solubilization. Passos et al. [99], for instance, achieved better methane yield treating biomass with less alkali (0.5% w/w KOH, 80 °C, 2h) than with the biomass treated using 2% w/w KOH at the same temperature. The concentration of potassium ions was 2.9 and 12.8 g/L for 0.5% w/w KOH and 2% w/w, respectively, indicating the inhibitory effect on methanogenic microorganisms associated with K<sup>+</sup> accumulation.

In the work of Santos et al. [105], pretreatment with HCl resulted in a 34% decreased methane production from anaerobic digestion of the marine species *I. galbana*, compared to the untreated microalgae. The poor performance of anaerobic digestion after pretreatment was ascribed to Na<sup>+</sup> buildup on the biomass, since the sodium concentration was 3.6 g/L. This high concentration was due to the use of NaOH to neutralize pH after acid pretreatment. By neutralizing the pH with Ca(OH)<sub>2</sub> and adding a washing step after pretreatment, the sodium concentration in the biomass dropped to 65 mg/L and the methane yield increased by 71.5% compared to the digestion of untreated biomass.

## **5. Comparative analysis of chemical and thermochemical pretreatments methods for algal biomass aimed at methane production**

To determine which conditions actually benefit methane production from the anaerobic digestion of algal biomass, a comparative analysis between chemical and thermochemical pretreatment methods was performed using the data from Table 4. From all 78 methods listed, the ones using NaOH and HCl were preselected considering they are widely employed in the literature. To assess the impact of pretreatment conditions on anaerobic digestion, the percentual variation in biomass solubilization degree ( $S_p$ ) and methane yield ( $Y_p$ ) were calculated based on the results for treated and untreated biomass. Then, a screening was performed adopting the following criteria: (i) solubilization increase  $\geq$  50% and (ii) a positive variation in methane yield. The screening resulted 28 pretreatment conditions, half of them being thermochemical using sodium hydroxide. Finally, the correlation between the pretreatment conditions (chemical concentration, temperature, and time) and the variables  $S_p$  and  $Y_p$  was analyzed within four pretreatment categories: a) chemical using NaOH; b) thermochemical using NaOH; c) chemical using HCl; and d) thermochemical using HCl.

From all chemical pretreatments using NaOH presented in Table 4, only five (B10, B18, B25, B29, and B30) showed a positive correlation between biomass solubilization increase and increased methane yield.

Nevertheless, apart from B10, the increase in methane yield was lower than 10%, meaning that alkaline pretreatment at room temperature has little influence on the final yield of anaerobic digestion. This is probably due to the high alkali concentrations needed to raise pH, leading to a Na<sup>+</sup> buildup and inhibition of methanogenic microorganisms [110,125]. Indeed, a negative effect of chemical concentration over methane production is observed. It is common to use NaOH concentrations up to 20 g/L, especially to reach pH  $\geq$  12, rendering NaOH pretreatments that are unfavorable for algal biomass conversion into biogas.

Almost all thermochemical pretreatments using NaOH listed in Table 4 allowed for a rise in biomass solubilization  $\geq$  50%. Nonetheless, only eight of them (B4-B6, B12, B20, B21, B45, B46) allowed for a positive variation in methane productivity, but no correlation was found between increased solubilization and improved methane production. As discussed earlier, biomass pretreatment plays an important role on organic matter solubilization, but, apart from biological pretreatment, most methods are not selective. Both temperature and reagent can break down a large number of molecules that make up the cell wall and other biomolecules; however, there is no way to control or predict which substances will be formed. Although they are in the soluble phase, recalcitrant components will not be used by the microorganisms, so there is no guarantee that every solubilized organic molecule will be converted to methane. Still for thermochemical pretreatment with NaOH, no correlation was found between alkali concentration and methane yield. However, temperature provides a positive effect on methane yield. Temperature can break hydrogen links between molecules, denature proteins, and depolymerize carbohydrates. Compared to other methods, thermal pretreatment alone has proven to be very efficient for anaerobic digestion, leading to methane yields similar or even superior to those obtained by physical or chemical pretreatments [111]. Time, unlike temperature, has a negative effect on methane yield probably due to the formation of recalcitrant components during lengthy pretreatments.

Data about acid pretreatment of algal biomass at room temperature for methane production are still scarce. Sposob et al. [104] attained a direct correlation between biomass solubilization and methane production when testing chemical pretreatment using HCl. Lower pH led to higher solubilization and higher yields. Nevertheless, the correlation found in this study cannot be generalized for other algal species or pretreatment conditions different from those investigated by the authors.

The majority of thermochemical pretreatments using HCl listed in Table 4 attained solubilizations over 50%, but only five of them (A15-A17, A23, and A27) raise the methane yield above 20%. There is no correlation between solubilization increase and the gain in methane yield from pretreated biomass. The reagent concentration has a strong negative influence on methane production. Carbohydrates broken down by a concentrated acid may generate 5-hydroxymethylfurfural and furfural; both inhibit the anaerobic microorganisms and impair methane production [100,101]. Regarding pretreatment time and temperature, mild temperatures and longer duration seem to favor anaerobic digestion. The strategy chosen by Passos et al. [99] is a good example of the best conditions for thermochemical pretreatment with HCl: diluted reagent (0.5% w/w), long time (2h) and mild temperature (80°C), resulting in a methane yield 82% higher than untreated biomass.

The dataset analyzed herein confirms the trends found in the scientific literature regarding the lack of correlation between biomass solubilization and methane production from algal biomass. Biomass degradability is clearly governed by multiple factors, beyond those mostly investigated so far. In the case of chemical and thermochemical pretreatments, this indicates the need to continue exploring alternative reagents and experimental conditions. For instance, alkali pretreatment is a traditional choice for many biomasses, but has little effect on algal biomass. Assessing pretreatment conditions based on their effects on methane yields prioritizes the best anaerobic digestion results, aiding in the choice of methods that actually benefit energy production rather than focusing on maximizing biomass solubilization. Moreover, the diversity of algal biomass chemical composition makes some pretreatment conditions effective for a particular species and indifferent to another. Therefore, identifying and choosing species that are more susceptible to pretreatment can also be a way to optimize methane production.

Table 5 shows the combined severity factors for thermochemical pretreatments selected for the comparative analysis. The severity factor is a concept introduced by Overend and Chornet [126] and was originally associated with steam explosion pretreatment of lignocellulosic biomass. According to them, the hemicellulose conversion into xylose reaction follows first-order kinetics in which the kinetic rate constant ( $k$ ) follows the Arrhenius Law.  $R_0$  is a factor known as reaction order and combines the effects of time and temperature of the steam explosion pretreatment. The severity factor is given by  $\log R_0$ . Since the steam explosion can be aided by an acid catalyst such as HCl or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a combined severity factor (CS) was proposed by Chum et al. [127] to account for the effect of the catalyst.

Negative CS (Table 5) was ascribed to non-severe pretreatments whenever low temperatures, pH, or duration time were used. Figure 3 shows the relationship between combined severity and the variation in biomass solubilization ( $S_p$ ) and methane yield ( $Y_p$ ). For acid pretreatment, higher solubilizations are associated to CS between 0.5 and 1.5, while the highest methane improvement happens at lower severities (Figure 3a). For alkaline pretreatment, except for B24, severe conditions are better for improving both solubilization and methane yield (Figure 3b). In B24, pretreatment achieved no difference for the anaerobic digestion of *Pavlova\_cf* since this species lacks a rigid cell wall and only has a cell membrane [7]. Severe pretreatments (i.e., higher log CS) more efficiently break down polysaccharides, increasing the availability of organic matter for anaerobic digestion. However, extreme conditions can lead to the formation of inhibitory compounds, making more severe pretreatment ineffective for methane production [128].

**Table 5.** Thermochemical pretreatment conditions and their associated combined severity factors.

Pretreatment	Temperature (°C)	Time (min)	pH	$R_0$	$\log R_0$	$\log CS$
A1	150	60	2	1779.66	3.25	1.25
A15	80	2	1	30.92	1.49	0.49
A16	80	2	0.6	30.92	1.49	0.89
A17	80	2	0.4	30.92	1.49	1.09
A18	40	960	1.1	16.43	1.22	0.12

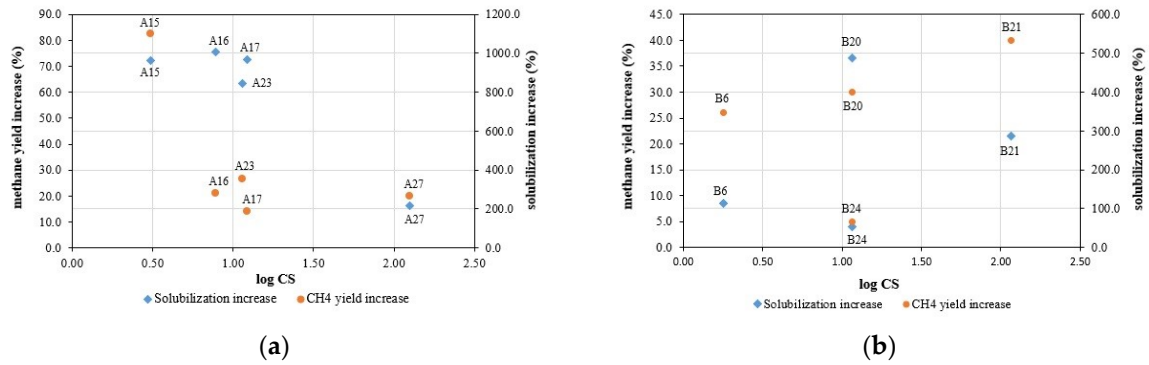
A23	105	102	1.1	143.16	2.16	1.06
A27	121	60	0.3	249.15	2.4	2.1
B4	50	60	3	2.02	0.31	-2.69
B5	100	60	3	60	1.78	-1.22
B6	150	60	3	1779.66	3.25	0.25
B12	140	30	4	451.72	2.65	-1.35
B20	120	30	1	116.41	2.07	1.07
B21	120	30	0	116.41	2.07	2.07
B24	120	30	1	116.41	2.07	1.07

$$R_0 = t * \exp\left(\frac{T_h - T_{ref}}{14.75}\right) [126].$$

where t = pretreatment time (min),  $T_{ref}$  = reference temperature (100 °C),  $T_h$  = pretreatment temperature (°C), 14.75 = constant factor associated with the hydrolysis activation energy.

CS – combined severity:  $\text{LogCS} = \text{Log}R_0 - \text{pH}$  [127].

For alkaline pretreatment, pH is replaced by pOH.



**Figure 3.** Relationship between the combined severity factor of thermochemical pretreatments with HCl and NaOH, solubilization ( $S_p$ ) and methane yield ( $Y_p$ ). (a) thermochemical pretreatment with acid (HCl). (b) thermochemical pretreatment with alkali (NaOH).

## 6. Energy assessment

Data from Tables 3 and 4 were used to assess the energy efficiency of algal biomass pretreatment methods. When an energy balance was not provided by the original work, the energy required for biomass pretreatment was calculated from the available information, according to equations 1 [129] and 2 [111]:

$$E_{in} = \left[ \frac{\rho V \gamma (T_p - T_0)}{m_{VS}} \right] + \left[ \frac{k A t (T_p - T_0) * 0.06}{m_{VS}} \right], \quad (1)$$

where  $E_{in}$  (kJ/g VS or kJ/g COD) is the energy input required for raising the biomass temperature from room temperature ( $T_0 = 25$  °C) to pretreatment temperature ( $T_p$ , °C),  $\rho$  is the density of the microalgae suspension (considered the same of pure water, 1.0 kg/L),  $V$  is biomass volume (1 L),  $\gamma$  is the specific heat of microalgae suspension (considered the same as pure water, 4.18 kJ/kg.°C),  $m_{VS}$  is the weight of biomass submitted to pretreatment (g VS or g COD),  $k$  is the heat transfer coefficient (1.0 W/m<sup>2</sup>.°C) [89,129,130],  $t$  is the pretreatment duration time (min), and  $A$  is the surface area (0.061 m<sup>2</sup>) of a vertical cylindrical reactor with total useful volume of 1.5 L and height/diameter ratio equals 2 [131].

$$E_{in} = \frac{V_R Y_R P_e}{C_S V}, \quad (2)$$

where  $E_{in}$  (kJ/g VS or kJ/g COD) represents the energy cost of manufacturing the reagents for chemical and thermochemical pretreatments.  $V_R$  is the volume (L) or mass (g) of reagents used in pretreatment;  $Y_R$  is the cost of chemicals (0.16 USD/mL HCl or 0.11 USD/g NaOH);  $P_e$  converts the monetary cost into energy cost and is equivalent to the inverse of the energy price for the industrial sector (27,481 kJ/USD);  $C_s$  is the concentration of biomass suspension (g VS/L or g COD/L) and  $V$  (L) is the volume of biomass submitted to pretreatment. The price of reagents was based on a commercial suppliers' website in July/2022, and energy prices (0.131 USD/kWh) were based on the average global electricity cost in 2021 [132].

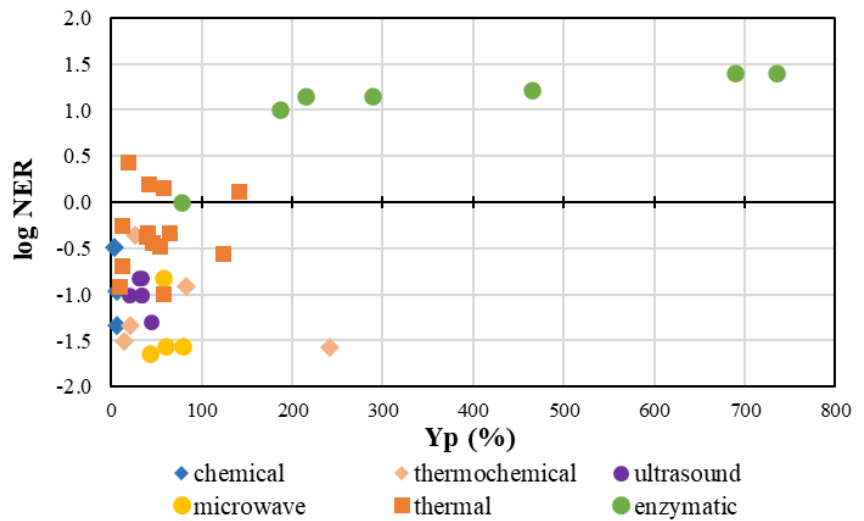
Equation 1 accounts for the energy necessary to elevate the microalgae temperature from room temperature to pretreatment temperature, and equation 2 accounts for the energetic costs of chemicals. Thus, the energy demand for thermal pretreatment is given by equation 1, and is calculated for thermochemical pretreatment by adding equations 1 and 2. Energy generated by anaerobic digestion of treated biomass,  $E_{out}$ , is given by equation 3 [111,129]:

$$E_{out} = \frac{\eta \Delta P \xi}{10^3}, \quad (3)$$

where  $\eta$  is the methane recovery efficiency (0.9),  $\Delta P$  is the increase in methane yield after pretreatment (NmL CH<sub>4</sub>/g VS<sub>in</sub> or NmL CH<sub>4</sub>/g COD<sub>in</sub>) and  $\xi$  is the lower heating value of methane (35.8 kJ/L CH<sub>4</sub>) [133].

To be economically feasible, the net energy ratio (NER =  $E_{out}/E_{in}$ ) must be higher than 1.0, meaning that the energy produced is enough to offset the energy demand. If  $NER < 1.0$ , energy needs to be supplemented by other sources (preferably renewable). However, this implies an extra investment in the process, making it less attractive from an economic point of view. Figure 4 shows the net energy ratio for many algal biomass pretreatment methods considering the increase in methane yield ( $Y_p$ ) achieved by pretreatment. When  $\log NER > 0$ , the energy balance is positive because more energy is produced than required;  $\log NER = 0$  means that all produced energy is consumed in the process, and when  $\log NER < 0$ , the energy produced is not enough to offset the demand, leading to a negative energy balance.

Only enzymatic pretreatment and four thermal pretreatment conditions achieve  $\log NER > 0$ . Biological pretreatment is frequently cited as less energy-intensive, as it does not require high temperatures or equipment with high electricity consumption. In the works of Ometto et al. [89] (Table 3, E1 to E6) and Çakmak and Ugurlu [91] (Table 3, E7), this method showed a favorable energy balance due to significant increases in methane yield after enzymatic pretreatment. However, the high cost of commercial enzymes still prohibits the implementation of this method on a large scale [131]. Economic assessment performed by Çakmak and Ugurlu [91] revealed that the price of enzymes should range between 0.18 and 0.28 €/L to make the process economically feasible under the investigated conditions.



**Figure 4.** Net energy ratio of different algal biomass pretreatment methods and methane yield increment ( $Y_p$ ).

Positive energy balance was achieved by thermal pretreatment of *Chlorella sorokiniana*. The most efficient condition for methane production (80 °C, 30 min) reached a net energy ratio of 2.7. Other physical methods (ultrasound, hydrothermal, and steam explosion) were explored in the same study [80] and, although they reached better methane yields, the energy demand was too high. Pretreatment of *Chlorella* sp. at 65 °C for 4 h [87] has the second best net energy ratio among thermal pretreatments in Table 3. Ometto et al. [89] also attained a positive energy balance for *Scenedesmus obliquus* hydrothermal pretreatment at 165 °C and 30 min. However, Passos et al. [86] demonstrated that even pretreatments at temperatures below 100°C do not achieve a positive energy balance if the biomass concentration is less than 2% TS, highlighting the importance of a biomass concentration step prior to pretreatment. Recently, to overcome the energy demand of the thermal pretreatment, some authors investigated systems that use solar energy to heat the biomass. Xiao et al. [90] proposed a solar-based system for hydrothermal pretreatment (155°C, 30 min) of *Chlorella pyrenoidosa*. Energy generated from anaerobic digestion of treated biomass was 3.64 times higher than the energy demand for pretreatment alone, and the net energy ratio for the whole process (pretreatment + anaerobic digestion) was 1.45. Similarly, Vassalle et al. [134] obtained a net energy ratio of 2.0 for the co-digestion of primary sludge and thermally pretreated algal biomass by using a solar-based system to heat the biomass.

Mechanical pretreatments are less attractive due to their high energy consumption. In the work of Passos et al. [83], a neutral energy balance was achieved for ultrasound pretreatment only when biomass was concentrated in a previous step.

Many studies address the effects of chemical and thermochemical pretreatments in anaerobic digestion of algal biomass, but only a few investigate the energy efficiency of such methods. Candia-Lomeli et al. [44] studied four methods for alkaline pretreatment of *Scenedesmus obtusiusculus*. Although the best solubilization occurred when using 15% CaO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5% v/v, anaerobic digestion was performed using biomass treated with less severe conditions to decrease the energy demand and overall process costs. Among the mild conditions tested,

pretreatment with NaOH 4 M led to a 47% increase in methane yield compared to the untreated biomass, and when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.5% was used as alkali, a 34% increase was achieved. Moreover, the extra energy produced with treated biomass allowed for a 14.3% cost reduction. However, in their study, anaerobic digestion was performed in alkaline pH using an anaerobic sludge previously adapted to such conditions. That means that no pH adjustment was needed after pretreatment, reducing the demand for chemicals. In addition, an already adapted sludge may be more resilient to imbalances that otherwise could inhibit methanogenic microorganisms, as discussed in section 4 (e.g., salt and free ammonia buildup).

Among all the pretreatment conditions selected for the comparative analysis, only eight of them contained enough information to determine the energy balance. None of the assessed chemical and thermochemical pretreatments achieved  $NER > 1.0$ . Even though chemical pretreatment is performed at room temperature, severe pH conditions are often required to maximize biomass solubilization [111,112], implying concentrated reagents that pose a risk of toxicity or inhibition for the anaerobic microorganisms. Thus, the increment in methane yield after alkaline pretreatment is often very low, and the energy produced is not enough to offset the energy demand. Thermochemical pretreatments assessed in this work were more efficient in enhancing methane production than the chemical ones. Nonetheless, neither of them achieved a positive energy balance. These conclusions are in accordance with the work of Marques et al. [131], after assessing 24 pretreatment methods, they indicated that alkali pretreatment is the least efficient for algal biomass anaerobic digestion, and thermochemical pretreatment is not efficient from an energy perspective.

Anaerobic digestion of algal biomass is not proposed as a stand-alone system. Rather, it should be implemented as an integrated process within wastewater treatment plants and biorefineries. Within this context, pretreatment might become feasible by optimizing the other existing processes. Ometto et al. [135] investigated six different scenarios for a wastewater treatment plant using microalgae for nitrogen and phosphorus removal in a tertiary treatment. The plant consists of an activated sludge unit, a stabilization pond, a flotation unit (to separate microalgae biomass from the treated effluent), a hydrothermal pretreatment unit for microalgae biomass, and the anaerobic reactor. When the conventional flotation unit was replaced by a more efficient one, the energy produced by co-digestion of treated algae biomass with activated sludge corresponded to 76% of the energy demand of the entire process. In this case, the energy almost doubled compared to the scenario in which no pretreatment was applied, and it was 1.33 times greater than using a diluted air flotation unit [135]. Passos et al. [136] assessed the energy balance for a 1500 m<sup>3</sup>/d wastewater treatment plant (WWTP) operating for a year. In a previous study, the same authors had determined that thermal pretreatment at 75 °C for 1 h was the most efficient, resulting in a 44% increase in methane yield from algal biomass co-digestion with activated sludge. Thus, this condition was selected for the WWTP assessment. When all biogas produced was used to generate heat and electricity in a combined heat and power unit (CHP), pretreatment was essential to guarantee the self-sufficiency of the WWTP throughout the year. Without algal biomass pretreatment, thermal energy



from external sources should be supplied to the plant during the winter months [136].

Anaerobic digestion can be integrated to other biological processes such as dark fermentation and photofermentation to increase the energy recovery from microalgae. Phanduang et al. [137] employed the *Chlorella* sp. biomass as a substrate to produce hydrogen and methane through integrated dark fermentation (DF), photo-fermentation (PF), and anaerobic digestion (AD) processes. The total energy yield increased from 0.51 kJ/g VS (with DF alone) to 1.86 kJ/g VS (with integrated DF-PF), and 5.98 kJ/g VS (with integrated DF-AD). However, the integrated processes were still not energetically feasible due to the high energy demand of the acid-hydrothermal pre-treatment employed for biomass hydrolysis. PolICASTRO et al. [138] also recommend the use of mixed cultures containing dark- and photo-fermentative bacteria, enriched with photosynthetic non-sulfur bacteria (PNSB), such as *Rhodospseudomonas* sp., to reduce costs and enhance the energy performance of integrated processes. According to the authors, dark fermentative bacteria convert complex substrates to simple compounds, which can be assimilated by PNSB without high-cost pretreatments or two separate steps of dark- and photo-fermentation.

## 7. Conclusions

Although pretreatment with NaOH is widely used, its efficiency for algal biomass is debatable since most cases analyzed led to an increase in methane yield of less than 20%. In contrast, acid pretreatment at room temperature has only been minimally explored, and more studies are needed to evaluate its effects on the anaerobic digestion of algal biomass.

No correlation was found between biomass solubilization and methane increment for chemical and thermochemical pretreatments using alkali or acid. The analyses suggest that thermochemical pretreatment with dilute acid, temperatures below 100°C, and long duration should be preferred, resulting in less severe conditions. Only enzymatic pretreatment and, in some cases, thermal pretreatment result in a positive energy balance.

In summary, there is still room for improvement in algal biomass pretreatment methods aimed at anaerobic digestion. Features including the suitability of different microalgae species considering their chemical composition; novel reagents; combined pretreatment methods; less energy-intensive technologies, such as solar-powered devices; and process integration should be further explored.

**Funding:** This research was funded by NATIONAL COUNCIL FOR SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT - CNPq, grant number 303406/2017-8; and CARLOS CHAGAS FILHO FOUNDATION FOR RESEARCH SUPPORT IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO – FAPERJ, grant number E-26/203.010/2018.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro for the financial support, and to the Program for Human Resources from the National Agency for Oil, Natural Gas and Biofuels – PRH-ANP for the scholarship granted to Maria C. de Oliveira.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Cavinato, C.; Ugurlu, A.; Godos, I.; Kendir, E.; Conzalez-Fernandez, C. Biogas production from microalgae. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R., Eds.; Woodhead Publishing: Kidlington, United Kingdom, 2017; pp. 155-182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00007-8>
2. Wang, S.; Mukhambet, Y.; Esakkimuthu, S. Integrated microalgal biorefinery—Routes, energy, economic and environmental perspectives. *J. Clean. Prod.* **2022**, *348*, 131245. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131245>
3. Barry, A.; Wolfe, A.; English, C.; Ruddick, C.; Lambert, D. National Algal Biofuels Technology Review. 2016, United States. <https://doi.org/10.2172/1259407>
4. Adarme, O.F.H.; Bâeta, B.E.L.; Lima, D.R.S.; Gurgel, L.V.A.; de Aquino, S.F. (2017). Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *109*, 288–299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.040>
5. Harun, R.; Davidson, M.; Doyle, M.; Gopiraj, R.; Danquah, M.; Forde, G. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass Bioenerg.* **2011**, *35*, 741–747. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.10.007>
6. Park, K.C.; Whitney, C.; McNichol, J.C.; Dickinson, K.E.; MacQuarrie, S.; Skrupski, B.P.; Zou, J.; Wilson, K.E.; O’Leary, S.J.B.; McGinn, P.J. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 339–348. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9772-2>
7. Bohutskyi, P.; Betenbaugh, M.J.; Bouwer, E.J. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresour. Technol.* **2014**, *155*, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.095>
8. Zabed, H.M.; Akter, S.; Yun, J.; Zhang, G.; Zhang, Y.; Qi, X. Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *117*, 109503. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109503>
9. Adeniyi, O.M.; Azimov, U.; Burluka, A. Algae biofuel: current status and future applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *90*, 316-335. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.067>
10. Lage, S.; Gojkovic, Z.; Funk, C.; Gentili, F.G. Algal biomass from wastewater and flue gases as a source of bioenergy. *Energies* **2018**, *11*, 664. <https://doi.org/10.3390/en11030664>
11. Chen, H.; Li, T.; Wang, Q. Ten years of algal biofuel and bioproducts: gains and pains. *Planta* **2019**, *249*, 195-219. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3066-8>
12. Saad, M.G.; Dosoky, N.S.; Zoromba, M.S.; Shafik, H.M. Algal biofuels: current status and key challenges. *Energies* **2019**, *12*, 1920. <https://doi.org/10.3390/en12101920>
13. Thompson, T.M.; Young, B.R.; Baroutian, S. Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. *Fuel Process. Technol.* **2019**, *195*, 106151, <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106151>
14. Choudhary, P.; Assemany, P.P.; Naaz, F.; Bhattacharya, A.; de Siqueira Castro, J.; do Couto Couto, E.D.A.; Calijuri, M.L.; Pant, K.K.; Malik, A. A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. *Sci. Total Environ.* **2020**, *726*, 137961. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137961>
15. De Carvalho, J.C.; Magalhães, A.I.; de Melo Pereira, G.V.; Medeiros, A.B.P.; Sydney, E.B.; Rodrigues, C.; Aulestia, D.T.M.; Vandenberghe, L.P.S.; Soccol, V.T.; Soccol, C.R. Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. *Bioresour. Technol.* **2020**, *300*, 122719. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122719>
16. Kannah, R.Y.; Kavitha, S.; Karthikeyan, O.P.; Rene, E.R.; Kumar, G.; Banu, J.R. A review on anaerobic digestion of energy and cost effective microalgae pretreatment for biogas production. *Bioresour. Technol.* **2021**, *332*, 125055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125055>
17. Javed M.U.; Mukhtar, H.; Hayat, M.T.; Rashid, U.; Mumtaz, M.W.; Ngamcharussrivichai, C. Sustainable processing of algal biomass for a comprehensive biorefinery. *J. Biotechnol.* **2022**, *352*, 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.009>
18. Bhatia, S.K.; Ahuja, V.; Chandel, N.; Gurav, R.; Bhatia, R.K.; Govarthan, M.; Tyagi, V.K.; Kumar, V.; Pugazendhi, A.; Banu, R.; Yang, Y.H. Advances in algal biomass pretreatment and its valorisation into biochemical and bioenergy by the microbial processes. *Bioresour. Technol.* **2022**, *358*, 127437. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127437>
19. Siddiki, S.Y.A.; Mofijur, M.; Kumar, P.S.; Ahmed, S.F.; Inayat, A.; Kusumo, F.; Badruddin, I.A.; Khan, T.M.Y.; Nghiem, L.D.; Ong, H.C.; Mahlia, T.M.I. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel* **2022**, *307*, 121782. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121782>

20. Gerardi, M.H. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*, 1st ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, USA, 2003; pp. 51-58.
21. Kinnunen, V. *Anaerobic Digestion of Microalgae and Pulp and Paper Biosludge*, Publication v.1434; Tampere University of Technology: Tampere, Finland, 2016; p. 12. <https://urn.fi/URN:ISBN:978-952-15-3876-6>
22. Braun, R. Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. In *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, 1st ed.; Ranalli, P., Eds.; Springer: Dordrecht, Netherlands, 2007; pp.335-416.
23. Al Seadi, T.; Rutz, D.; Prassl, H.; Köttner, M.; Finsterwalder, W.; Volk, S.; Janssen, R. (2008). *Biogas Handbook*, 1st ed.; University of Southern Denmark: Esbjerg, Denmark, 2008; p. 41.
24. Yen, H.W.; Brune, D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 130-134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.010>
25. Sialve, B.; Bernet, N.; Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.001>
26. Weiland, P. Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 849-860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
27. Schnürer, A.; Jarvis, Å. *Microbiology of the Biogas Process*, 1st ed.; Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden, 2018; pp. 41-46.
28. Lee, R.A.; Lavoie, J.M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Anim. Front.* **2013**, *3*, 6-11. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0010>
29. Correa, D.F.; Beyer, H.L.; Possingham, H.P.; Thomas-Hall, S.R.; Schenk, P.M. Biodiversity impacts of bioenergy production: Microalgae vs. first generation biofuels. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *74*, 1131-1146. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.068>
30. Golueke, C.G.; Oswald, W.J.; Gotaas, H.B. Anaerobic digestion of algae. *Appl. Microbiol.* **1957**, *5*, 47-55. <https://doi.org/10.1128%2Fam.5.1.47-55.1957>
31. Golueke, C.G.; Oswald, W.J. Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Appl. Microbiol.* **1959**, *7*, 219–227. <https://doi.org/10.1128%2Fam.7.4.219-227.1959>
32. Golueke, C.G.; Oswald, W.J. Power from solar energy via algae produced methane. *Sol. Energy* **1963**, *7*, 86–92. [https://doi.org/10.1016/0038-092X\(63\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0038-092X(63)90033-1)
33. Golueke, C.G.; Oswald, W.J. Harvesting and processing sewage-grown planktonic algae. *J. Water Pollut. Control Fed.* **1965**, *37*, 471-498. <http://www.jstor.org/stable/25035278>
34. Oswald, W.J. Gas Production from Microalgae. In *Proceedings of the Symposium Clean Fuels from Biomass, Sewage, Urban Refuse, Agricultural Wastes*, Orlando, USA., January 27-30, 1976.
35. Benemann, J.R.; Weissman, J.C.; Koopman, B.L.; Oswald, W.J. (1977). Energy production by microbial photosynthesis. *Nature* **1977**, *268*, 19-23. <https://doi.org/10.1038/268019a0>
36. Eisenberg, D.M.; Oswald, W.J.; Benemann, J.R.; Gobel, R.P.; Tiburzi, T.T. Methane Fermentation of Microalgae. In *Proceedings of the first International Symposium on Anaerobic Digestion*, 1st ed.; Stafford, D.A., Wheatley, B.L., Hughes, D.E., Eds.; Applied Science Publishers: London, United Kingdom, 1980; Volume 1, pp. 99-111.
37. Oswald, W.J.; Green, F.B.; Lundquist, T.J. Performance of methane fermentation pits in advanced integrated wastewater pond systems. *Water Sci. Technol.* **1994**, *30*, 287-295.
38. Green F.B.; Lundquist, T.J.; Oswald, W.J. Energetics of advanced integrated wastewater pond systems. *Water Sci. Technol.* **1995**, *31*, 9–20. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00488-9](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00488-9)
39. Chen, P.H.; Oswald, W.J. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environ. Int.* **1998**, *24*, 889–897. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00080-4)
40. Mussnug, J.H.; Klassen, V.; Schlüter, A.; Kruse, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>
41. Zhao, B.; Ma, J.; Zhao, Q.; Laurens, L.; Jarvis, E.; Chen, S.; Frear, C. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. *Bioresour. Technol.* **2014**, *161*, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.079>
42. Solé-Bundó, M.; Carrère, H.; Garfí, M.; Ferrer, I. Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). *Algal Res.* **2017**, *24*, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.025>
43. Markou, G.; Ilkiv, B.; Brulé, M.; Antonopoulos, D.; Chakalis, L.; Arapoglou, D.; Chatzipavlidis, I. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal biomass after the extraction of valuable compounds. *Biomass Conv. Bioref.* **2022**, *12*, 419–426. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00703-3>
44. Candia-Lomeli, M.; Tapia-Rodríguez, A.; Morales-Ibarria, M.; Razo-Flores, E.; Celis, L.B. Anaerobic digestion under alkaline conditions from thermochemical pretreated microalgal biomass. *BioEnergy Res.* **2022**, *15*, 346-356. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10325-w>

45. Kröger, M.; Müller-Langer, F. Review on possible algal-biofuel production processes. *Biofuels* **2012**, *3*, 333–349. <https://doi.org/10.4155/bfs.12.14>
46. De Godos, I.; González, C.; Becares, E.; Garcia-Encina, P.A.; Muñoz, R. Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 187–194. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1825-3>
47. Park, K.Y.; Lim, B.R.; Lee, K. Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant. *Water Sci. Technol.* **2009**, *59*(11), 2111–2116. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.233>
48. Molinuevo-Salces, B.; Garcia-González, M.C.; González-Fernández, C. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 5144–5149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.006>
49. Anjos, M.; Fernandes, B.D.; Vicente, A.A.; Teixeira, J.A.; Dragone, G. Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *139*, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032>
50. Rusten, B.; Sahu, A.K. Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy. *Water Sci. Technol.* **2011**, *64*, 1195–1201. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.722>
51. Salama, E.S.; Kurade, M.B.; Abou-Shanab, R.A.; El-Dalatony, M.M.; Yang, I.S.; Min, B.; Jeon, B.H. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *79*, 1189–1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>
52. D'Hondt, E.; Martin-Juarez, J.; Bolado, S.; Kasperoviciene, J.; Koreiviene, J.; Sulcius, S.; Elst, K.; Bastiaens, L. Cell disruption technologies. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 1st ed.; Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R., Eds.; Woodhead Publishing: Kidlington, United Kingdom, 2017; pp. 133–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>
53. Wang, J.; Yin, Y. Fermentative hydrogen production using pretreated microalgal biomass as feedstock. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0871-5>
54. González-González, L.M.; Correa, D.F.; Ryan, S.; Jensen, P.D.; Pratt, S.; Schenk, P.M. Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *82*, 1137–1148. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.091>
55. Saratale, R.G.; Kumar, G.; Banu, R.; Xia, A.; Periyasamy, S.; Saratale, G.D. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresour. Technol.* **2018**, *262*, 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.030>
56. Passos, F.; Gutiérrez, R.; Brockmann, D.; Steyer, J.-P.; García, J.; Ferrer, I. Microalgae production in wastewater treatment systems, anaerobic digestion and modelling using ADM1. *Algal Res.* **2015**, *10*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.008>
57. Lu, Y.; Liaquat, R.; Astals, S.; Jensen, P.D.; Batstone, D.J.; Tait, S. Relationship between microbial community, operational factors and ammonia inhibition resilience in anaerobic digesters at low and moderate ammonia background concentrations. *N. Biotechnol.* **2018**, *44*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.02.013>
58. Zamalloa, C.; Boon, N.; Verstraete, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl. Energy* **2012**, *92*, 733–738. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.017>
59. Song, M.; Pham, H.D.; Seon, J.; Woo, H.C. Overview of anaerobic digestion process for biofuels production from marine macroalgae: a developmental perspective on brown algae. *Korean J. Chem. Eng.* **2015**, *32*, 567–575. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0039-5>
60. Frigon, J.-C.; Matteau-Lebrun, F.; Abdou, R.H.; McGinn, P.J.; O'Leary, S.J.B.; Guiot, S.R. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl. Energy* **2013**, *108*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.051>
61. Mahdy, A.; Mendez, L.; Ballesteros, M.; González-Fernández, C. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Convers. Manag.* **2014**, *85*, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.097>
62. Passos, F.; Solé, M.; Garcia, J.; Ferrer, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment. *Appl. Energy* **2013**, *108*, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.042>
63. Passos, F.; Ferrer, I. Microalgae conversion to biogas: thermal pretreatment contribution on net energy production. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 7171–7178. <https://doi.org/10.1021/es500982v>
64. Inglesby, A.E.; Fisher, A.C. Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 7996–8006.
65. Wang, M.; Sahu, A.K.; Rusten, B.; Park, C. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp and waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.096>

66. Prajapati, S.K.; Malik, A.; Vijay, V.K. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Appl. Energy* **2014**, *114*, 790–797. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.08.021>
67. Ayala-Parra, P.; Liu, Y.; Field, J.A.; Sierra-Alvarez, R. Nutrient recovery and biogas generation from the anaerobic digestion of waste biomass from algal biofuel production. *Renew. Energy* **2017**, *108*, 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.02.085>
68. Polakovičová, G.; Kušnir, P.; Nagyová, S.; Mikulec, J. Process integration of algae production and anaerobic digestion. *Chem. Eng. Trans.* **2012**, *29*, 1129–1134. <https://doi.org/10.3303/CET1229189>
69. Ras, M.; Lardon, L.; Bruno, S.; Bernet, N.; Steyer, J.P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.146>
70. Mendez, L.; Mahdy, A.; Demuez, M.; Ballesteros, M.; González-Fernández, C. Effect of high thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: organic matter solubilisation and biochemical methane potential. *Fuel* **2014**, *117*, 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.032>
71. Park, K.Y.; Kweon, J.; Chantrasakdakul, P.; Lee, K.; Cha, H.Y. Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. *Int. Biodeter. Biodegradation* **2013**, *85*, 598–602. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.035>
72. Mendez, L.; Mahdy, A.; Timmers, R.A.; Ballesteros, M.; González-Fernández, C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour. Technol.* **2013**, *149*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.136>
73. Lee, K.; Chantrasakdakul, P.; Kim, D.; Kong, M.; Park, K. Y. Ultrasound pretreatment of filamentous algal biomass for enhanced biogas production. *Waste Manag.* **2014**, *34*, 1035–1040. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.012>
74. Zeng, S.; Yuan, X.; Shi, X.; Qiu, Y. Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *178*, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.047>
75. Quinn, J.C.; Hanif, A.; Sharville, S.; Bradley, T.H. Microalgae to biofuels: life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. *Bioresour. Technol.* **2014**, *171*, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.037>
76. González-Fernández, C.; Sialve, B.; Bernet, N.; Steyer, J.P. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg.* **2012**, *40*, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.008>
77. Scholz, M.J.; Weiss, T.L.; Jinkerson, R.E.; Jing, J.; Roth, R.; Goodenough, U.; Posewitz, M.C.; Gerken, H.G. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 1450–1464. <https://doi.org/10.1128/EC.00183-14>
78. Arnold, A.A.; Genard, B.; Zito, F.; Tremblay, R.; Warschawski, D.E.; Marcotte, I. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by <sup>13</sup>C solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **2015**, *1848*, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.017>
79. González-Fernández, C.; Sialve, B.; Bernet, N.; Steyer, J.P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* **2012**, *6*, 205–218. <https://doi.org/10.1002/bbb.337>
80. Córdova, O.; Passos, F.; Chamy, R. Physical pretreatment methods for improving microalgae anaerobic biodegradability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *185*, 114–126. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2646-6>
81. Jankowska, E.; Sahu, A.K.; Oleskowicz-Popiel, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *75*, 692–709. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045>
82. Rodriguez, C.; Alaswad, A.; Mooney, J.; Prescott, T.; Olabi, A.G. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Process. Technol.* **2015**, *138*, 765–779. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.06.027>
83. Passos, F.; Astals, S.; Ferrer, I. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. *Waste Manag.* **2014**, *34*, 2098–2103. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.004>
84. Wilson, C.A.; Novak, J.T. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water Res.* **2009**, *43*, 4489–4498. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.022>
85. González-Fernández, C.; Sialve, B.; Bernet, N.; Steyer, J. P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresour. Technol.* **2012**, *110*, 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.043>
86. Passos, F.; García, J.; Ferrer, I. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* **2013**, *138*, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.114>

87. Scarcelli, P.G.; Serejo, M.L.; Paulo, P.L.; Bónucz, M.A. Evaluation of biomethanization during co-digestion of thermally pretreated microalgae and waste activated sludge, and estimation of its kinetic parameters. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*, 135745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135745>
88. Passos, F.; Ferrer, I. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res.* **2014**, *68*, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.015>
89. Ometto, F.; Quiroga, G.; Pšenička, P.; Whitton, R.; Jefferson, B.; Villa, R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. *Water Res.* **2014**, *65*, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.040>
90. Xiao, C.; Liao, Q.; Fu, Q.; Huang, Y.; Chen, H.; Zhang, H.; Xia, A.; Zhu, X.; Reungsang, A.; Liu, Z. A solar-driven continuous hydrothermal pretreatment system for biomethane production from microalgae biomass. *Appl. Energy* **2019**, *236*, 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.12.014>
91. Çakmak, E. K.; Ugurlu, A. Enhanced biogas production of red microalgae via enzymatic pretreatment and preliminary economic assessment. *Algal Res.* **2020**, *50*, 101979. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101979>
92. Córdova, O.; Passos, F.; Chamy, R. Enzymatic pretreatment of microalgae: cell wall disruption, biomass solubilisation and methane yield increase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2019**, *189*, 787–797. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03044-8>
93. Hom-Díaz, A.; Passos, F.; Ferrer, I.; Vicent, T.; Blázquez, P. Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. *Algal Res.* **2016**, *19*, 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.006>
94. Giménez, J.B.; Aguado, D.; Bouzas, A.; Ferrer, J.; Seco, A. Use of rumen microorganisms to boost the anaerobic biodegradability of microalgae. *Algal Res.* **2017**, *24*, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.003>
95. Kendir, E.; Ugurlu, A. A comprehensive review on pretreatment of microalgae for biogas production. *Int. J. Energy Res.* **2018**, *42*, 3711–3731. <https://doi.org/10.1002/er.4100>
96. Bohutskyi, P.; Bouwer, E. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs. In *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 1st ed.; Lee, J., Eds.; Springer: New York, USA, 2013; pp. 873–975. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4\\_36](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_36)
97. Ariunbaatar, J.; Panico, A.; Esposito, G.; Pirozzi, F.; Lens, P. N. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Appl. Energy* **2014**, *123*, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.035>
98. Torres, M.L.; Lloréns, M.D.C.E. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Manag.* **2008**, *28*, 2229–2234. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.10.006>
99. Passos, F.; Felix, L.; Rocha, H.; de Oliveira Pereira, J.; de Aquino, S. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: thermochemical pretreatment and biogas production. *Bioresour. Technol.* **2016**, *209*, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.006>
100. Amin, F.R.; Khalid, H.; Zhang, H.; Zhang, R.; Liu, G.; Chen, C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Amb Express* **2017**, *7*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>
101. Ghasimi, D.S.; Aboudi, K.; de Kreuk, M.; Zandvoort, M.H.; van Lier, J.B. Impact of lignocellulosic-waste intermediates on hydrolysis and methanogenesis under thermophilic and mesophilic conditions. *Chem. Eng. J.* **2016**, *295*, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.045>
102. Marques, A.D.L.; Pinto, F.P.; Araújo, O.Q.D.F.; Cammarota, M.C. Assessment of methods to pretreat microalgal biomass for enhanced biogas production. *J. Sustain. Dev. Energy Water Environ. Syst.* **2018**, *6*, 394–404. <https://doi.org/10.13044/j.sdewes.d5.0193>
103. Samson, R.; Leduy, A. Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol. Lett.* **1983**, *5*, 671–676. <https://doi.org/10.1007/BF01386360>
104. Sposob, M.; Kim, D.H.; Yun, G.S.; Yun, Y.M. Assessment of the relationship between solubilization and biogas production on anaerobic digestion of pretreated lipid-extracted microalgae waste. *Biomass Bioenerg.* **2020**, *141*, 105702. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105702>
105. Santos, N.O.; Oliveira, S.M.; Alves, L.C.; Cammarota, M.C. Methane production from marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Bioresour. Technol.* **2014**, *157*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.091>
106. Sukias, J.; Craggs, R. Enhanced Methane Yields from Microalgal Digestion with Various Pre-Treatments. In Proceedings of the 7th IWA Specialist Group Conference on Waste Stabilization Ponds, Bangkok, Thailand, 2006.
107. Rincón-Pérez, J.; Razo-Flores, E.; Morales, M.; Alatríste-Mondragón, F.; Celis, L.B. Improving the biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by thermochemical pretreatment to produce hydrogen and methane. *BioEnergy Res.* **2020**, *13*, 477–486. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10067-w>
108. Cheng, Q.; Deng, F.; Li, H.; Qin, Z.; Wang, M.; Li, J. (2018). Nutrients removal from the secondary effluents of municipal domestic wastewater by *Oscillatoria tenuis* and subsequent co-digestion with pig manure. *Environ. Technol.* **2018**, *39*, 3127–3134. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1375020>

109. Juárez, J.M.; Pastor, E.R.; Sevilla, J.M.F.; Torre, R.M.; García-Encina, P.A.; Rodríguez, S.B. Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. *Bioresour. Technol.* **2018**, *257*, 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.063>
110. Penaud, V.; Delgenès, J.P.; Moletta, R. Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass: influence of sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 258-263. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00037-X)
111. Cho, S.; Park, S.; Seon, J.; Yu, J.; Lee, T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microbial biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *143*, 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.017>
112. Qiu, Y.; Frear, C.; Chen, S.; Ndegwa, P.; Harrison, J.; Yao, Y.; Ma, J. Accumulation of long-chain fatty acids from *Nannochloropsis salina* enhanced by breaking microalgae cell wall under alkaline digestion. *Renew. Energy* **2020**, *149*, 691-700. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.093>
113. Du, X.; Tao, Y.; Liu, Y.; Li, H. Stimulating methane production from microalgae by alkaline pretreatment and co-digestion with sludge. *Environ. Technol.* **2020**, *41*, 1546-1553. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1540665>
114. Atelge, M.R.; Atabani, A.E.; Banu, J.R.; Krisa, D.; Kaya, M.; Eskicioglu, C.; Kumar, G.; Lee, C.; Yildiz, Y.S.; Unalan, S.; Mohanasundaram, R.; Duman, F. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. *Fuel* **2020**, *270*, 117494. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>
115. Roselet, F.; Vandamme, D.; Muylaert, K.; Abreu, P.C. Harvesting of microalgae for biomass production. In *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, 1st ed.; Alam, M., Wang, Z., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 211-243. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_10)
116. Ward, A.J.; Lewis, D.M.; Green, F.B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Res.* **2014**, *5*, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>
117. Alzate, M.E.; Muñoz, R.; Rogalla, F.; Fdz-Polanco, F.; Pérez-Elvira, S.I. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2012**, *123*, 488-494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.113>
118. Magdalena, J.A.; Ballesteros, M.; González-Fernandez, C. Efficient anaerobic digestion of microalgae biomass: proteins as a key macromolecule. *Molecules* **2018**, *23*, 1098. <https://doi.org/10.3390/molecules23051098>
119. Torres, Á.; Feroso, F.G.; Rincón, B.; Bartacek, J.; Borja, R.; Jeison, D. Challenges for cost-effective microalgae anaerobic digestion. In *Biodegradation - Engineering and Technology*, 1st ed.; Chamy, R., Rosenkranz, F., Eds.; InTechOpen: London, United Kingdom, 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/55975>
120. McCarty, P.L. Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public Works* **1964**, *95*, 107-112.
121. Jiang, Y.; McAdam, E.; Zhang, Y.; Heaven, S.; Banks, C.; Longhurst, P. Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review. *J. Water Process Eng.* **2019**, *32*, 100899. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100899>
122. Yenigün, O.; Demirel, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. *Process Biochem.* **2013**, *48*(5-6), 901-911. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>
123. Kwietniewska, E.; Tys, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *34*, 491-500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.041>
124. Hanaki, K.; Matsuo, T.; Nagase, M. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23*, 1591-1610. <https://doi.org/10.1002/bit.260230717>
125. Kim, J.; Yu, Y.; Lee, C. Thermo-alkaline pretreatment of waste activated sludge at low-temperatures: effects on sludge disintegration, methane production, and methanogen community structure. *Bioresour. Technol.* **2013**, *144*, 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.115>
126. Overend, R.P.; Chornet, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. Royal Soc. A, Math. Phys. Eng. Sci.* **1987**, *321*, 523-536. <https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>
127. Chum, H.L.; Johnson, D.K.; Black, S.K.; Overend, R.P. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *24*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/BF02920229>
128. Ferreira, L.C.; Donoso-Bravo, A.; Nilsen, P.J.; Fdz-Polanco, F.; Pérez-Elvira, S.I. Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. *Bioresour. Technol.* **2013**, *143*, 251-257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.065>
129. Passos, F.; Uggetti, E.; Carrère, H.; Ferrer, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2014**, *172*, 403-412. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.042>
130. Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H.D. *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4th ed.; McGraw Hill Higher Education: New York, USA, 2003.

131. Marques, A.D.L.; Araújo, O.D.Q.F.; Cammarota, M.C. Biogas from microalgae: an overview emphasizing pretreatment methods and their energy return on investment (EROI). *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 193-201. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2629-x>
132. Electricity Prices Around the World. Available online: [https://www.globalpetrolprices.com/electricity\\_prices/?s=09](https://www.globalpetrolprices.com/electricity_prices/?s=09) (accessed on August 6, 2022).
133. Lewandowski, D.A. *Design of Thermal Oxidation Systems for Volatile Organic Compounds*, 1st ed.; CRC Press: Washington DC, USA, 1999. <https://doi.org/10.1201/9781315141060>
134. Vassalle, L.; Passos, F.; Rosa-Machado, A.T.; Moreira, C.; Reis, M.; Freitas, M.P.; Ferrer, I.; Mota, C.R. The use of solar pre-treatment as a strategy to improve the anaerobic biodegradability of microalgal biomass in co-digestion with sewage. *Chemosphere* **2022**, *286*, 131929. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131929>
135. Ometto, F.; Whitton, R.; Coulon, F.; Jefferson, B.; Villa, R. Improving the energy balance of an integrated microalgal wastewater treatment process. *Waste Biomass Valori.* **2014**, *5*, 245–253. <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9230-2>
136. Passos, F.; Gutiérrez, R.; Uggetti, E.; Garfi, M.; García, J.; Ferrer, I. Towards energy neutral microalgae-based wastewater treatment plants. *Algal Res.* **2017**, *28*, 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.010>
137. Phanduang, O.; Lunprom, S.; Salakkam, A.; Liao, Q.; Reungsang, A. Improvement in energy recovery from *Chlorella* sp. biomass by integrated dark-photo biohydrogen production and dark fermentation-anaerobic digestion processes. *Int. J. Hydrog. Energy* **2019**, *44*, 23899-23911. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.103>
138. Policastro, G.; Cesaro, A.; Fabbicino, M. Photo-fermentative hydrogen production from cheese whey: Engineering of a mixed culture process in a semi-continuous, tubular photo-bioreactor. *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, In Press.