



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE PESQUISA EM BIOENERGIA



---

PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, UNICAMP, USP) DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOENERGIA

---

# **Síntese e aplicação de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}^0$ e $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ na digestão anaeróbia do glicerol bruto**

**Mateus Eugenio Boscaro**

RIO CLARO – SP  
2022

---

PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, UNICAMP, USP) DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOENERGIA

---

## Síntese e aplicação de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}^0$ e $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ na digestão anaeróbia do glicerol bruto

Mateus Eugenio Boscaro

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia – Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Bioenergia.

Orientadora: Dra. Sandra Imaculada Maintinguer

B741s Boscaro, Mateus Eugenio  
Síntese e aplicação de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>0</sub> e NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> na digestão anaeróbia do glicerol bruto / Mateus Eugenio Boscaro. -- Rio Claro, 2022  
122 p. : il., tabs., fotos  
  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Rio Claro  
Orientadora: Sandra Imaculada Maintinguer  
  
1. Metanogênese. 2. Nanopartículas. 3. Consórcios anaeróbios. 4. Glicerol. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** Síntese e aplicação de nanopartículas de  $Fe_3O_4$ ,  $FeO$  e  $NiFe_2O_4$  na digestão anaeróbia do glicerol bruto

**AUTOR: MATEUS EUGENIO BOSCARO**


**ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOENERGIA (USP, UNICAMP E UNESP), área: Bioenergia pela Comissão Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SANDRA IMACULADA MAINTINGUER (Participação Virtual)  
Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro

Documento assinado digitalmente

 IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE  
Data: 11/08/2022 17:43:02-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Sorocaba



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LORENA OLIVEIRA PIRES (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ADILSON ROBERTO GONÇALVES (Participação Virtual)  
IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia - IPBEN



Prof. Dr. ARIOVALDO JOSÉ DA SILVA (Participação Virtual)  
Faculdade de Engenharia Agrícola - Unicamp

Rio Claro, 09 de agosto de 2022

O sol se levanta e o sol se põe,  
e depressa volta ao lugar de onde se levanta.

O vento sopra para o sul e vira para o norte;  
dá voltas e mais voltas, seguindo sempre o seu curso.

Todos os rios vão para o mar, contudo o mar nunca se enche;  
ainda que sempre corram para lá, para lá voltam a correr.

O que foi tornando a ser, o que foi feito se fará novamente;  
não há nada novo debaixo do sol.

*Eclesiastes 1*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade de São Paulo e Universidade Estadual de Campinas.

Ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN, UNESP – Campus Rio Claro.

Ao Laboratório de Bioprocessos.

À Professora Dra. Sandra Imaculada Maintiguer pela orientação, amizade e oportunidades.

Ao Professor Dr. Michel Brienzo pela compreensão e apoio.

A todos os colegas do Laboratório de Bioprocessos, em especial: Daiana, Danieli, Luan, Romário e Carol.

À Fundação Municipal de Saúde de Rio Claro, especialmente aos nobres colegas da Vigilância Sanitária.

À minha esposa, Mariana, e aos meus pais, Pedro e Antônia, pela paciência.

## RESUMO

O uso de aditivos nanoparticulados nos processos de digestão anaeróbia de resíduos agroindustriais e os efeitos de nanopartículas metálicas em comunidades microbianas e na produção de biogás são temas de grande interesse, mas ainda pouco explorados no Brasil. A indústria do biodiesel gera como principal resíduo o glicerol bruto, que possui elevada demanda de oxigênio e quantidades substanciais de impurezas como metanol, ácidos graxos, sabões e outros compostos orgânicos e inorgânicos. Por esse motivo, o glicerol bruto tem sido utilizado por muitos pesquisadores como substrato para a produção de biogás. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi produzir em laboratório nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ), estáveis e atóxicas e utilizá-las como aditivos em processos de digestão anaeróbia de glicerol bruto visando elevar as eficiências de geração de metano. As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  foram sintetizadas pelo método da coprecipitação e estabilizadas com citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ). As nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  foram sintetizadas pelo método de redução de íons de ferro por borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e estabilizadas com citrato. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Os métodos utilizados para síntese *in loco* de nanopartículas produziram  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com diâmetro inferior a 20 nm e  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  com diâmetros entre 50 e 100 nm. Reatores anaeróbios em batelada de 500 mL (250 mL de volume reacional), inoculados com lodo granular anaeróbio, foram utilizados para avaliar a influência de diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  na digestão anaeróbia do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel. Reatores controle também foram montados sem a adição de nanopartículas. A produção de biogás foi quantificada pelos métodos de deslocamento de volume, a composição por cromatografia gasosa e os consumos de matéria orgânica por quantificação de demanda química de oxigênio (DQO). Nos reatores anaeróbios suplementados com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}^0$ , em concentrações de 200, 400 e 800  $\text{mg L}^{-1}$ , foi observado efeito positivo na produção acumulada de metano, taxa máxima de produção de metano e remoção de DQO, quando comparados aos reatores controle. Foram verificados aumentos de 49,8% na produção acumulada de  $\text{CH}_4$  nos reatores com 200  $\text{mg-Fe}_3\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ , de 36% da taxa máxima de produção de  $\text{CH}_4$  nos reatores com 400  $\text{mg-Fe}^0 \text{ L}^{-1}$  e de 50% na remoção de DQO nas primeiras 170 horas de operação nos reatores com 200  $\text{mg-Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ . Nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  não apresentaram efeito significativo na digestão anaeróbia do glicerol bruto para os reatores com 200 e 400  $\text{mg-NiFe}_2\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ . Além disso, foi verificado efeito deletério, com redução de 30% na produção de metano e remoção de DQO nos reatores operados com 800  $\text{mg-NiFe}_2\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ . Também foi observado aumento substancial na abundância relativa dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, especialmente as ordens *Bacteroides*, *Clostridiales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, após suplementação com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . A adição de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  favoreceu as comunidades de bactérias e arqueias envolvidas no consumo do glicerol, elevando a produção de  $\text{CH}_4$ .

**Palavras-chave:** metanogênese, reatores anaeróbios, glicerol bruto, magnetita, ferro zero-valente, ferrita de níquel, sequenciamento, consórcios anaeróbios

## ABSTRACT

The use of nanoparticulate additives in anaerobic digestion of agroindustrial residues and the effects of metallic nanoparticles on microbial communities and biogas production are topics of great interest today, but still poorly explored in Brazil. The biodiesel industry generates crude glycerol as its major residue, which has high oxygen demand and substantial amounts of impurities such as methanol, fatty acids, soaps and other organic and inorganic compounds. For this reason, crude glycerol has been used by many researchers as a substrate for biogas production. Therefore, this work aimed to produce stable and non-toxic magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), zero-valent iron ( $\text{Fe}^0$ ) and nickel ferrite ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) nanoparticles and use them as additives in anaerobic digestion of crude glycerol aiming to increase methane generation efficiencies.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles were synthesized by the coprecipitation method and stabilized with citrate ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ).  $\text{Fe}^0$  nanoparticles were synthesized by the method of iron ions reduction using sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ) and stabilized with citrate. Nanoparticles were characterized by Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Dynamic Light Scattering (DLS). The methods designed for *in loco* synthesis produced  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles with diameters below 20 nm and  $\text{Fe}^0$  and  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles with diameters between 50 and 100 nm. Anaerobic batch reactors (250 mL reaction volume), filled with anaerobic granular sludge, were used for assessing the influence of different concentrations of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  and  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles on the anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel production. Control reactors were also assembled without the addition of nanoparticles. Biogas production was quantified by water displacement method and gas chromatography and substrate consumption was evaluated by COD analysis. In anaerobic batch reactors containing  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}^0$  nanoparticles, in concentrations of 200, 400 and 800  $\text{mg L}^{-1}$  a positive effect was observed in the total volume of methane, maximum rate of methane production and COD removal, in relation to control reactors. There were increases of 49.8% in the accumulated production of  $\text{CH}_4$  in reactors with 200  $\text{mgFe}_3\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ , 36% in the maximum rate of  $\text{CH}_4$  production in reactors with 400  $\text{mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$  and 50% of COD removal in the first 170 hours of operation in reactors with 200  $\text{mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ .  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles had no significant effect on the anaerobic digestion of crude glycerol in reactors with 200 and 400  $\text{mg NiFe}_2\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$  and had a deleterious effect, with 30% reduction in methane production and COD removal, in reactors with 800  $\text{mg NiFe}_2\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ . It was also observed a substantial increase on relative abundance of *Bacteria* and *Archaea* Domains, specially *Bacteroides*, *Clostridiales*, *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales* orders, after anaerobic digestion supplemented with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. The addition of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles could improve and optimizes bacterial and archaeal communities involved in glycerol consumption, enhancing the  $\text{CH}_4$  production.

**Keywords:** methanogenesis, anaerobic reactors, crude glycerol, magnetite, zerovalent iron, nickel ferrite, sequencing, anaerobic consortium



## SUMÁRIO

1	Introdução.....	15
2	Objetivos.....	18
3	Revisão Bibliográfica.....	19
3.1	Digestão Anaeróbia.....	19
3.1.1	Bioquímica e Síntese do Biogás.....	19
3.1.2	Microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.....	23
3.1.3	transferência direta de elétrons interespécies (DIET).....	24
3.2	Nanopartículas.....	31
3.2.1	Nanopartículas de magnetita e ferrita de níquel.....	36
3.2.2	Nanopartículas de ferro zero-valente.....	37
3.3	Glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel.....	38
3.3.1	Biodiesel no Brasil.....	38
3.3.2	Síntese do biodiesel.....	41
3.3.3	Glicerol bruto.....	43
3.3.4	Digestão anaeróbia do Glicerol bruto.....	43
4	Material e Métodos.....	50
4.1	Etapas experimentais.....	50
4.2	Etapa 1 – Nanopartículas.....	50
4.2.1	Síntese das nanopartículas.....	50
4.2.2	Caracterização.....	53
4.3	Etapa 2 – Testes preliminares.....	53
4.3.1	Inóculo.....	54
4.3.2	Substrato.....	54
4.3.3	Teste 1 – Tamponamento.....	54
4.3.4	Teste 2 – Quantidades de inóculos.....	55
4.4	Etapa 3 – Ensaio com adição de nanopartículas.....	55
4.5	Análises físico-químicas e cromatográficas.....	56
4.5.1	Demanda química de oxigênio (DQO).....	56
4.5.2	Ferro total.....	57
4.5.3	Quantificação dos volumes de biogás produzidos.....	58
4.5.4	Quantificação das frações de biogás no headspace.....	59
4.5.5	Ajuste de dados ao modelo de Gompertz.....	59

4.6 Etapa 4 – Identificação em larga escala dos consórcios anaeróbios.....	61
5 Resultados e Discussão.....	63
5.1 Síntese e Caracterização das nanopartículas.....	63
5.2 Caracterização do lodo granular anaeróbio.....	75
5.3 Testes preliminares.....	76
5.4 Ensaio de produção de biogás com adição de nanopartículas.....	80
5.4.1 Magnetita.....	80
5.4.2 Ferro zero-valente.....	84
5.4.3 Ferrita de níquel.....	88
5.5 Identificação em larga escala dos consórcios anaeróbios.....	93
6 Conclusões.....	102
7 Referências Bibliográficas.....	104
Anexos.....	117

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Processos bioquímicos e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia de matéria orgânica (adaptado de Aquino et al., 2005).....	20
Figura 2: (a) transferência indireta de elétrons interespecies; transferência direta de elétrons interespecies por meio de (b) condutores orgânicos, (c) condutores inorgânicos com grandes superfícies de contato e (d) condutores inorgânicos nanométricos. (adaptado de Li et al., 2021).....	26
Figura 3: Síntese do biodiesel por meio de transesterificação alcalina.....	42
Figura 4: Fermentação do glicerol em compostos mais simples (adaptado de Biebl et al. (1999) e Viana et al. (2012)).....	45
Figura 5: Otimização e integração da digestão anaeróbia de glicerol à indústria e matriz energética brasileira.....	49
Figura 6: Método para quantificação de volume de metano produzido. Adaptado de Aquino et al. (2007).....	58
Figura 7: (a) Solução coloidal de nanopartículas de $Fe_3O_4$ estabilizadas com citrato, em processo de separação magnética; (b) material em pó obtido após a secagem de nanopartículas de $Fe_3O_4$ .....	63
Figura 8: MEV dos aglomerados nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ).....	64
Figura 9: MEV das nanopartículas de $Fe_3O_4$ : (a) estruturas esféricas formando aglomerados; (detalhe) partículas com diâmetro estimado inferior a 20 nm.....	65
Figura 10: MEV dos aglomerados nanopartículas de ferro zero-valente ( $Fe^0$ ).....	66
Figura 11: MEV das nanopartículas de $Fe^0$ : (a) e (b) aglomerados formados por partículas esféricas com diâmetro 50 e 100 nm.....	67
Figura 12: MEV das nanopartículas de $NiFe_2O_4$ : (a) aglomerados da ordem de $1\mu m$ ; (b) partículas assimétrico com tamanho aproximado de 100 nm formando aglomerados.....	68
Figura 13: Mapa composicional de partícula de $NiFe_2O_4$ produzido por EDS. Detalhes: distribuição dos átomos de Fe, Ni e O na superfície da partícula.....	69
Figura 14: espectro de EDS e a porcentagem em massa para cada elemento.....	69
Figura 15: Distribuições de tamanho de partículas obtidas por DLS para as nanopartículas de $Fe_3O_4$ .....	70
Figura 16: Distribuições de tamanho de partículas obtidas por DLS para as nanopartículas de $Fe^0$ .....	72

Figura 17: Distribuições de tamanho de partículas obtidas por DLS para as nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ .....	73
Figura 18: Evolução do pH em função do tempo para diferentes tipos e concentrações de soluções tampão.....	76
Figura 19: Produção acumulada de metano para diferentes quantidades de inóculo.....	78
Figura 20: Volumes acumulados de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	80
Figura 21: Taxas de produção de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	81
Figura 22: Eficiência de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	83
Figura 23: Volumes acumulados de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{Fe}^0$ .....	84
Figura 24: Taxas de produção de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{Fe}^0$ .....	85
Figura 25: Eficiência de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{Fe}^0$ .....	87
Figura 26: Volumes acumulados de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ .....	88
Figura 27: Taxas de produção de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ .....	89
Figura 28: Eficiência de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ .....	90
Figura 29: Cromatograma e tabela de picos para o ensaio controle após 160 h.....	91
Figura 30: Cromatograma e tabela de picos para o ensaio com $200 \text{ mg L}^{-1}$ de nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ após 160 h.....	92
Figura 31: Abundâncias relativas de microrganismos no inóculo e na amostra retirada de reator suplementado com $200 \text{ mg L}^{-1}$ de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4$ após 170 horas de operação em relação aos: (a) Domínios; (b) Filos; (c) Classes; (d) Ordens e (e) Famílias.....	95
Figura 32: Possível rota metabólica baseada nos microrganismos identificados na amostra do reator suplementado com $200 \text{ mg L}^{-1}$ de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4$ após 170 horas de operação.	100

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos envolvidos em DIET a partir de diferentes substratos e materiais condutores.....	29
Tabela 2: Efeito de nanopartículas na produção de biogás.....	32
Tabela 3: Projeção dos percentuais mínimos de adição de biodiesel ao óleo diesel até 2023. .	40
Tabela 4: Produção mensal de biodiesel no Brasil*.....	40
Tabela 5: Produção de biodiesel por Região (março/2022).....	41
Tabela 6: Percentual de matéria-prima utilizada na fabricação de biodiesel (março/2022)....	42
Tabela 7: Estudos prévios com ênfase em digestão e co-digestão anaeróbia de glicerol bruto	46
Tabela 8: Parâmetros padronizados para os reatores anaeróbios em batelada.....	56
Tabela 9: Teores de sólidos e ferro no lodo granular anaeróbio.....	75
Tabela 10: Valores mínimos e finais de pH para diferentes soluções tamponantes.....	76
Tabela 11: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes quantidades de inóculo.....	78
Tabela 12: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $Fe_3O_4$ .....	81
Tabela 13: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $Fe^0$ .....	85
Tabela 14: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de $NiFe_2O_4$ .....	89
Tabela 15: Efeito relativo da adição de nanopartículas sobre a dinâmica de produção de $CH_4$ e consumo de matéria orgânica.....	92
Tabela 16: Valores quantitativos e estatísticos de biodiversidade nas amostras coletadas.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP – Agência Nacional do Petróleo  
APHA – *American Public Health Association*  
CNPE – Conselho Nacional de Política Energética  
DIET – *direct interspecies electron transfer*  
DLS – *Dynamic Light Scattering*  
DQO – Demanda Química de Oxigênio  
EDS – Espectroscopia por Energia Dispersiva  
GC – *Gas Chromatography*  
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
OTU – *Operational Taxonomic Units*  
PCR – *Polymerase Chain Reaction*  
SST – Sólidos Suspensos Totais  
ST – Sólidos Totais  
STF – Sólidos Totais Fixos  
STV – Sólidos Totais Voláteis  
TCD – *Thermal Conductivity Detector*  
UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, preocupações com as mudanças climáticas, com o aumento da demanda por energia e com as incertezas relacionadas à exploração e ao preço dos combustíveis fósseis levou à busca de novas e mais sustentáveis fontes de energia.

De acordo com Henrik Lund (2010), *energia sustentável* é comumente definida como as fontes de energia que não se esgotam em um período de tempo relevante para a raça humana e que contribuam para a sustentação de todas as espécies na Terra. Outros autores como Yoro et al. (2021), por exemplo, definem energia sustentável como uma estrutura completa com oferta e demanda de energia baseada em energia renovável em oposição a combustíveis fósseis e nucleares.

Neste contexto, países como o Brasil seguem aumentando sua infraestrutura de geração de energia hidroeétrica, além de investirem cada vez mais em alternativas promissoras como a energia eólica e solar ou a transformação de resíduos e biomassa em biocombustíveis líquidos e biogás. Segundo Pottmaier et al. (2013), a Agência Internacional de Energia (IEA), prevê que a partir da década de 2030 cerca de 30% do consumo total de energia será de fontes renováveis. De acordo com os autores, o futuro da biomassa como fonte de energia é muito promissor, principalmente em países subdesenvolvidos, onde a geração de resíduos para esse fim é muito grande. Aliado ao desenvolvimento de novas técnicas e novos materiais, o crescimento e desenvolvimento da geração de energia a partir de biomassa só tem aumentado ano a ano.

Dentre estas novas técnicas para geração de energia a partir de biomassa, a produção industrial de biogás via digestão anaeróbia de resíduos tem se mostrado atrativa (de Sá et al., 2014), apesar das dificuldades inerentes ao processo.

A digestão anaeróbia pode ser considerada um processo sustentável de mitigação de poluentes e de geração de energia renovável, principalmente pela geração do biogás a partir de resíduos orgânicos provenientes da agricultura, pecuária, tratamento de esgoto, lixo orgânico doméstico e processos industriais (Blasius et al., 2020; He et. al., 2021). Além disso, o biogás proveniente da digestão anaeróbia tem potencial para substituir em partes o consumo de gases combustíveis de origem não renováveis como o gás natural e o gás liquefeito de petróleo.

Em relação à produção de energia, devido ao poder calorífico elevado do metano (890 kJ/mol), a combustão controlada do biogás produz calor que pode ser utilizado em caldeiras

ou transformado em eletricidade em geradores termoelétricos (McAllister et al., 2011). No entanto, apesar dos reconhecíveis avanços nesses processos biológicos, a produção de energia a partir do biogás ainda é pouco expressiva se comparada a outras fontes renováveis como a energia solar ou eólica (Dehghani et al., 2019).

Assim, em vista dos possíveis benefícios energéticos e ambientais da produção de biogás por meio da digestão anaeróbia de resíduos domésticos e agroindustriais, muitas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de introduzir abordagens inovadoras que aumentem a eficiência, competitividade e abrangência do processo.

Destaca-se, dentre os resíduos agroindustriais com potencial para geração de biogás, o glicerol bruto advindo da produção de biodiesel. Desde 2005, leis federais estabeleceram um percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil, levando a um aumento significativo na produção deste biocombustível (Rodrigues, 2021). O principal subproduto gerado pela produção do biodiesel é o glicerol bruto, e sua produção equivale a aproximadamente 10% de todo o biodiesel produzido (Yazdani & Gonzalez, 2012).

Além disso, o glicerol bruto pode conter níveis substanciais de impurezas, incluindo metanol, sais de sódio e potássio, outros metais, sabões, umidade, ácidos graxos e outros compostos orgânicos (Viana et al., 2012).

Desta forma, devido ao grande volume de glicerol produzido em conjunto com o biodiesel e devido à necessidade de biorremediação deste composto e de suas impurezas, muitos pesquisadores têm estudado o uso do glicerol bruto como substrato em processos de digestão anaeróbia, visando a produção de metano ( $\text{CH}_4$ ) (Viana et al., 2012), hidrogênio (Rodrigues et al., 2019) e outras substâncias de maior valor agregado.

A aplicação de nanopartículas em processos que envolvem digestão anaeróbia está recebendo crescente atenção nos últimos anos, visando maior eficiência na conversão dos resíduos e aumento na produção de biogás (Dehghani et al., 2019). Devido às suas características notáveis como tamanho, superfície de contato, condutividade e estabilidade química, as nanopartículas de diferentes composições químicas e morfologias estão sendo utilizadas como aditivos em processos de digestão anaeróbia de diversos substratos, incluindo o glicerol puro (Im et al., 2019).

Dentre os muitos nanomateriais já sintetizados, as nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos têm se destacado como opções baratas e viáveis de nano-aditivos para produção de biogás. Quando em solução, tais nanopartículas são capazes, por exemplo, de liberar gradualmente íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , indispensáveis em processos intracelulares como replicação de DNA, geração de energia e outras funções vitais, beneficiando e otimizando as comunidades



microbianas envolvidas na digestão anaeróbia e aumentando a eficiência do processo de conversão de matéria orgânica em biogás (Casals et al., 2013; He et al., 2021).

Além disso, estudos recentes têm evidenciado que nanomateriais condutores desempenham papel significativo na digestão anaeróbia, intermediando a transferência direta de elétrons entre espécies de microrganismos envolvidos na conversão de substratos orgânicos em metano (Li et al., 2021). Ao se otimizar o processo de DIET (do inglês, *direct interspecies electron transfer*) pode-se promover aumento de eficiência da degradação de matéria orgânica e maior produção de biogás.

Diante disso, o estudo da aplicação de nanopartículas de ferro, níquel e seus óxidos, como aditivos nos processos de produção de biogás em reatores anaeróbios mostra-se promissor. Desenvolver aplicações inovadoras de nanopartículas na área da digestão anaeróbia contribuirá com avanços na produção de energia limpa e sustentável e no tratamento de resíduos industriais, tais como o glicerol bruto advindo da produção de biodiesel.

Assim, o objetivo desse trabalho foi sintetizar nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) biocompatíveis e biodegradáveis por métodos simples e econômicos e utilizá-las de forma sustentável em reatores anaeróbios para elevar a produção de biogás, utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel.

## 2 OBJETIVOS

### GERAL

Sintetizar nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) biocompatíveis e biodegradáveis e aplicá-las, de forma sustentável, na produção de biogás, a partir dos consumos de glicerol bruto por digestão anaeróbia.

### ESPECÍFICOS

- Desenvolver método de síntese de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  que sejam simples e reprodutíveis em laboratórios de pesquisa e indústrias;
- Determinar a influência de diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  na remoção de DQO e eficiência de produção de biogás em reatores anaeróbios em batelada alimentados com glicerol bruto;
- Estabelecer parâmetros otimizados de uso de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  visando o aumento do consumo de substrato e produção de biogás em meios contendo glicerol residual da produção de biodiesel.
- Investigar impacto na diversidade das comunidades de bactérias e arqueias envolvidas na conversão de glicerol bruto em metano em reatores suplementados com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DIGESTÃO ANAERÓBIA

##### 3.1.1 BIOQUÍMICA E SÍNTESE DO BIOGÁS

O biogás é uma fonte renovável de energia produzido por meio da digestão anaeróbia de matéria orgânica, em geral advinda de resíduos da agricultura e pecuária, lodo de esgoto, lixo orgânico doméstico e resíduos orgânicos de processos industriais.

Digestão anaeróbia é o processo biológico no qual matéria orgânica, na ausência de oxigênio livre e por meio de reações químicas coordenadas pelas enzimas produzidas por diferentes grupos de microrganismos anaeróbios específicos, é convertida em uma mistura de gases, o biogás (Ganzoury & Allam, 2015). O biogás é composto, aproximadamente, por 50 – 70% de metano ( $\text{CH}_4$ ), 30 – 50% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), bem como por frações menores de outros gases como nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), oxigênio ( $\text{O}_2$ ), vapor de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e amônia ( $\text{NH}_3$ ) (Rajaeifar et al., 2017).

Além da produção de biogás visando a geração de energia, a digestão anaeróbia também pode ser utilizada na biorremediação de poluentes orgânicos, inorgânicos e no tratamento de águas residuárias. O material digerido residual, o digestato, uma mistura de sólidos e líquidos ricos em nutrientes como nitrogênio e fósforo, pode ser aplicado como fertilizante de alta qualidade em terras agrícolas, o que diminui a demanda por fertilizantes minerais (Nkoa, 2014).

Quatro principais estágios estão envolvidos no processo de digestão anaeróbia para a produção de biogás: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Mao et al. 2015). Estes estágios são interdependentes e ocorrem de forma simultânea, tal como ilustrado na Figura 1.

Parâmetros do meio onde ocorre a digestão anaeróbia, tais como temperatura, pH, macro e micronutrientes, afetam as condições de desenvolvimento dos microrganismos e influenciam diretamente em cada um dos quatro estágios da digestão.

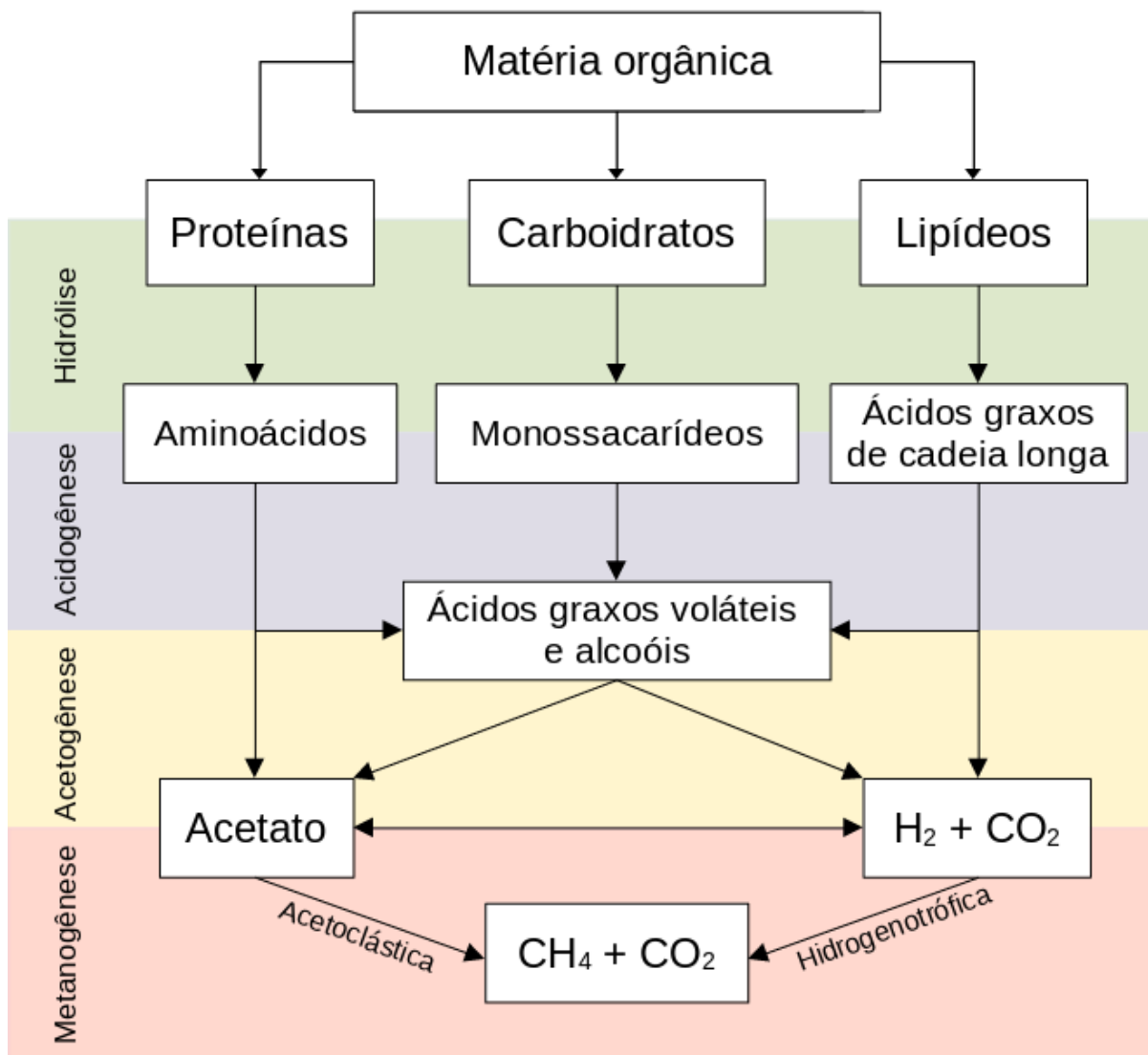
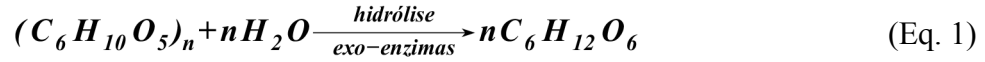


Figura 1: Processos bioquímicos e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia de matéria orgânica (adaptado de Aquino et al., 2005)

A hidrólise, o primeiro estágio da digestão anaeróbia, ocorre quando substratos poliméricos, principalmente polissacarídeos (celulose, hemicelulose, amido), lipídios e proteínas, reagem com a água, com o auxílio de enzimas extracelulares chamadas hidrolases (por exemplo, celulase, xilanase, pectinase, amilase, lipase e protease) secretadas por bactérias hidrolíticas, produzindo monômeros ou oligômeros, como glicose e celobiose a partir da celulose, glicose e maltose a partir do amido, xilose a partir de hemicelulose, aminoácidos a partir de proteínas e ácidos graxos de cadeia longa e glicerol a partir de lipídios (Mao et al. 2015).

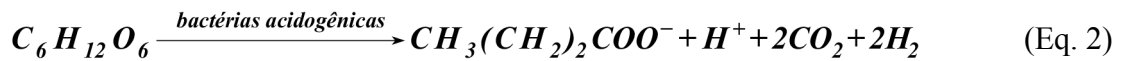
Um exemplo de reação hidrolítica é apresentado pela Equação 1, onde um polissacarídeo de fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é quebrado via hidrólise em monômeros de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ).



Geralmente, os processos hidrolíticos são resistentes às variações de pH e temperatura do meio e adaptam-se a diferentes substratos. Os valores de pH na faixa de 6 a 8 fornecem condições ideais para a hidrólise (Van et al., 2020).

A acidogênese, o segundo e mais rápido estágio da digestão anaeróbia, ocorre quando os produtos da hidrólise são metabolizados no interior de bactérias fermentativas acidogênicas e transformados em ácidos graxos voláteis (ácidos carboxílicos de cadeias curtas), tais como ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico e ácido valérico, bem como etanol (Mao et al. 2015). Dióxido de carbono, hidrogênio, amônia e sulfetos também são produzidos durante a acidogênese.

As Equações 2 e 3 representam a conversão de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) em butirato ( $CH_3(CH_2)_2COO^-$ ) e propionato ( $CH_3CH_2COO^-$ ), respectivamente.



Durante a fase acidogênica, o pH do meio influenciará diretamente na produção de ácidos graxos voláteis. Devido ao deslocamento de equilíbrio químico, em meios mais ácidos (pH entre 4 e 6) haverá favorecimento da produção de ácido butírico (Eq. 2) e em meios mais alcalinos (pH entre 6 e 8) o favorecimento da produção de ácido propiônico (Eq. 3). O rápido processo de acidogênese pode causar acúmulo de ácidos graxos voláteis e queda acentuada do pH quando o biorreator está sobrecarregado com substratos de fácil digestão. Por sua vez, o acúmulo de ácidos graxos voláteis pode causar perda de eficiência e falhas no processo digestão anaeróbia. A formação de ácidos graxos voláteis é inibida em pH inferior a 4. Considera-se como ideal para a fase acidogênica a faixa de pH entre 5,5 e 6,5 (Van et al., 2020).

No terceiro estágio, a acetogênese, bactérias acetogênicas oxidam a maior parte dos produtos da acidogênese em acetato ( $CH_3COO^-$ ), hidrogênio ( $H_2$ ) e gás carbônico ( $CO_2$ ).

As Equações 4 e 5 representam, respectivamente, a conversão dos íons butirato ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$ ) e propionato ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ ) em acetato, hidrogênio e gás carbônico.

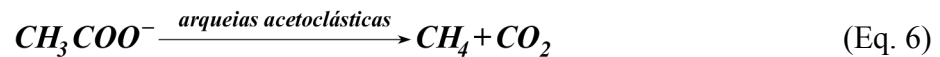


Considera-se como ideal para a fase acetogênica manter o pH entre 6,0 e 6,2 (Van et al., 2020).

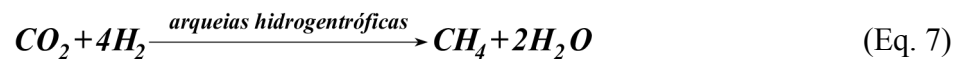
O conjunto de produtos gerados pela acetogênese formam o substrato ideal para o estágio final da digestão anaeróbia, a metanogênese.

Na metanogênese, acetato ( $\text{CH}_2\text{COO}^-$ ), hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) são convertidos em metano ( $\text{CH}_4$ ) pela ação de duas classes distintas de microrganismos: arqueias metanogênicas acetoclásticas e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (Poh et al., 2015).

Na metanogênese acetoclástica metano e gás carbônico são formados a partir da fermentação do ácido acético, como representado pela Equação 6. Arqueias acetoclásticas são predominantes na digestão anaeróbia e correspondem a cerca de 70% da produção de metano.



O restante do metano produzido pela digestão anaeróbia é gerado pelo processo hidrogenotrófico, onde hidrogênio e gás carbônico reagem para formar metano e água de acordo com a Equação 7 (Merlin et al., 2014).



Arqueias metanogênicas são sensíveis ao pH e presença de gás oxigênio ( $\text{O}_2$ ), amônia ( $\text{NH}_3$ ), ácido sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e ácidos graxos voláteis. Em relação ao pH, o processo de metanogênese como um todo pode ser comprometido quando o pH do meio torna-se inferior a 6,2 ou superior 7,8. Considera-se como ideal para a fase metanogênica manter o pH entre 7,0 e 7,2 (Van et al., 2020).

### 3.1.2 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Converter compostos orgânicos complexos em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> durante a digestão anaeróbia só é possível devido à cooperação de quatro grupos funcionais únicos e interdependentes de microrganismos. Por esta razão, numerosos estudos já foram realizados com o objetivo de conhecer os microrganismos presentes nos digestores anaeróbios e compreender a influência destes na eficiência e estabilidade dos processos de digestão anaeróbia.

A identificação destes microrganismos ocorreu, a princípio, por meio de técnicas de cultivo e análise de colônias. Entretanto, nas últimas décadas as técnicas de biologia molecular, incluindo, por exemplo, amplificação por PCR e sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S, superaram as limitações dos métodos baseados em cultivo e permitiram a identificação de microrganismos não cultiváveis, revelando uma grande diversidade dos microbiomas envolvidos na digestão anaeróbia (Lim et al., 2020).

A digestão anaeróbia é governada por organismos unicelulares procariontes e classificados em dois domínios: *Bacteria* e *Archaea*. Dentre estes organismos se encontram bactérias hidrolíticas, bactérias fermentativas (acidogênicas e acetogênicas) e três tipos de microrganismos metanogênicos pertencentes ao domínio *Archaea*. Tais microrganismos ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e terrestres e cumprem importantes papéis ecológicos durante o processo de decomposição da matéria orgânica (Shah et al., 2014).

Bactérias hidrolíticas são filogeneticamente diversas, entretanto, a maior parte dos microrganismos envolvidos na fase de hidrólise da digestão anaeróbia estão classificados entre os filos *Firmicutes* e *Bacteroides* (Lim et al., 2020).

Os produtos hidrolíticos são, por sua vez, fermentados por microrganismos acidogênicos. Todas as bactérias hidrolíticas encontradas em digestores anaeróbios, incluindo os filos *Firmicutes* e *Bacteroides*, também podem utilizar os produtos de hidrólise como substratos de crescimento para produzir ácidos graxos voláteis. Além dos *Firmicutes* e *Bacteroides*, os filos *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* e *Atribacteria* contêm muitas espécies de bactérias acidogênicas relatadas em digestores anaeróbios. Bactérias acidogênicas estritamente não-hidrolíticas também pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* (no filo *Actinobacteria*), *Lactobacillus*, *Anaerolineaceae* (no filo *Chloroflexi*) e algumas bactérias termofílicas não hidrolíticas são atribuídas ao filo *Thermotogae* (Lim et al., 2020).

Acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> resultantes da etapa acidogênica podem ser utilizados diretamente pelas arqueias metanogênicas para a produção de biogás. Entretanto, outros produtos da aci-

dogênese, incluindo propionato, butirato e outros ácidos graxos voláteis, não são consumidos pelas arqueias (Schink & Stams, 2005).

Os ácidos graxos voláteis, bem como os ácidos graxos de cadeia maiores provenientes da hidrólise lipídica, são degradados e transformados nos substratos da metanogênese através da acetogênese sintrófica, durante a qual os produtos hidrolíticos e acidogênicos são oxidados em acetato,  $H_2$  e  $CO_2$ . Muitas espécies de bactérias consideradas hidrolíticas e acetogênicas foram atribuídas taxonomicamente aos gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Thermotoga*. Em especial, espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Smithella*, *Syntrophobacter*, *Ruminococcus* e *Pelotomaculum* têm a capacidade de oxidar propionato e espécies dos gêneros *Syntrophus* e *Syntrophomonas* oxidam butirato e ácidos graxos de cadeia longa em acetato,  $H_2$  e  $CO_2$  (Ziemiński & Fraç, 2012; Lim et al., 2020).

Por fim, a metanogênese é realizada pelas arqueias metanogênicas, as quais são categorizadas em três grupos de acordo com os substratos consumidos preferencialmente em cada um dos grupos: arqueias metanogênicas acetoclásticas utilizam o acetato para produzir  $CH_4$ ; arqueias metanogênicas hidrogenotróficas utilizam  $H_2$  e  $CO_2$  para gerar  $CH_4$  e; arqueias metanogênicas metilotróficas que produzem  $CH_4$  a partir de compostos metílicos, como metanol, metilaminas e sulfetos de metila (Lim et al., 2020; Anderson et al., 2009). A metanogênese hidrogenotrófica de  $H_2$  e  $CO_2$  é encontrada em quase todas as ordens metanogênicas, isto é, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* e *Methanocellales*, com exceção das *Methanomassiliicoccales*. Por outro lado, a metanogênese acetoclástica a partir do acetato pode ser encontrada apenas na ordem *Methanosarcinales*. A metanogênese metilotrófica a partir de compostos metilados é encontrada nas ordens *Methanomassiliicoccales*, *Methanobacteriales* e *Methanosarcinales* (Enzmann et al., 2018).

### 3.1.3 TRANSFERÊNCIA DIRETA DE ELÉTRONS INTERESPÉCIES (DIET)

Como discutido anteriormente, durante a digestão anaeróbia, as comunidades microbianas convertem matéria orgânica em biogás através de uma série de reações bioquímicas. Desta forma, entende-se que a estabilidade e eficiência deste processo depende de relações entre várias espécies de microrganismos, e que a transferência de elétrons entre esses microrganismos desempenha um papel significativo na digestão anaeróbia (Madigan, 2012). Uma via metanogênica recentemente descoberta envolve transferência direta de elétrons interespecíes (em inglês, *direct interspecies electron transfer* – DIET), em complemento à transfe-



rência interespécies de hidrogênio (principal mecanismo implicado à metanogênese hidrogenotrófica).

A transferência interespécies de elétrons é um termo generalista que referencia o mecanismo pelo qual microrganismos sintróficos cooperadores perdem e recebem elétrons durante a oxidação da matéria orgânica e redução do  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$  (Batstone et al., 2006). O fluxo de elétrons entre as complexas comunidades microbianas anaeróbias é, portanto, responsável pela ocorrência destas reações e pelas taxas em que elas acontecem. De acordo com Li et al. (2021), acreditava-se que os elétrons eram transferidos entre os microrganismos sintróficos apenas de maneira indireta por meio de transportadores solúveis como  $\text{H}_2$  e  $\text{HCOO}^-$  (íons metanoato) (Lovley, 2017a), tal como ilustrado na Figura 2(a).

No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a transferência de elétrons unicamente por meio de  $\text{H}_2$  e  $\text{HCOO}^-$  é relativamente lenta e indireta, devido à ineficiência da difusão e às grandes distâncias intercelulares envolvidas (Lovley, 2017b). Concentrações elevadas de  $\text{H}_2$  e  $\text{HCOO}^-$  também tornam a degradação de ácidos graxos voláteis, como propionato e butirato, termodinamicamente desfavoráveis (Qiao et al., 2016). Além disso, o metabolismo das bactérias produtoras de hidrogênio é inibido quando há concentrações elevadas de  $\text{H}_2$  em solução, o que favorece o acúmulo de ácidos graxos voláteis. Conseqüentemente, devido à toxicidade dos ácidos graxos voláteis e à diminuição do pH, ocorre inibição da metanogênese e diminuição da eficiência do processo de digestão anaeróbia (McCarty & McKinne, 1961). Por fim, Walker et al. (2020) estimaram que a taxa de produção de hidrogênio por bactérias sintróficas durante a digestão anaeróbia contribuem com menos de 10% da taxa de produção de metano, o que também indica que  $\text{H}_2$  e  $\text{HCOO}^-$  não são os principais transportadores de elétrons.

Desta forma, estudos publicados nos últimos 10 anos têm proposto a transferência direta de elétrons interespécies – DIET como uma explicação alternativa à transferência de elétrons entre microrganismos sintróficos via  $\text{H}_2$  e outros transportadores solúveis. Diversos estudos têm evidenciado de forma direta e indireta a ocorrência de DIET durante a digestão anaeróbia. Além disso, o papel e os mecanismos de transferência direta de elétrons interespécies na digestão anaeróbia de substratos simples já foram propostos e discutidos.

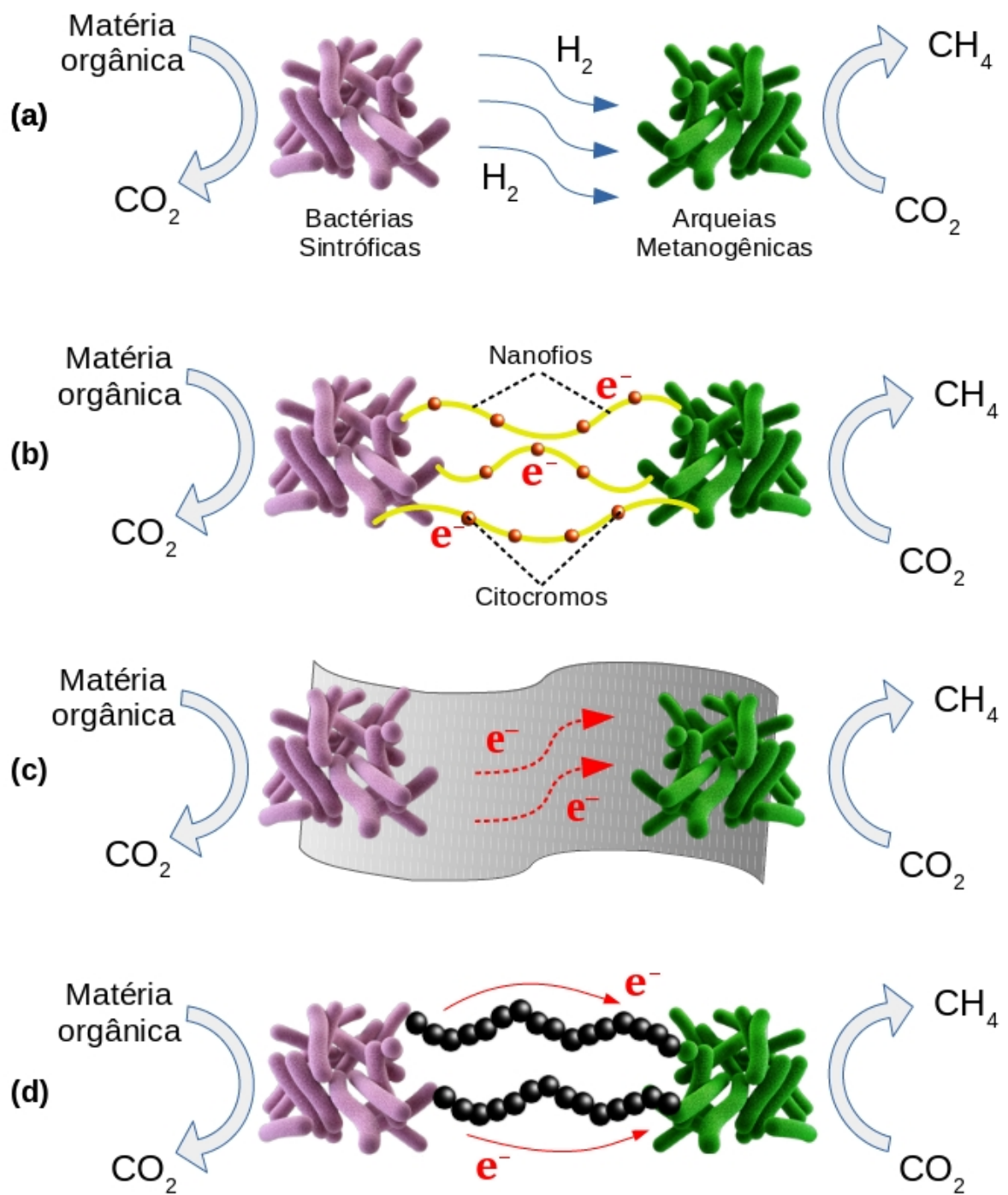


Figura 2: (a) transferência indireta de elétrons interespecíficas; transferência direta de elétrons interespecíficas por meio de (b) condutores orgânicos, (c) condutores inorgânicos com grandes superfícies de contato e (d) condutores inorgânicos nanométricos. (adaptado de Li et al., 2021)

Tais pesquisas têm sugerido que em processos de digestão anaeróbia mediados por DIET a transferência de elétrons ocorre de maneira mais rápida (Lin et al., 2017) e por meio de reações bioquímicas termodinamicamente mais favoráveis (Mei et al., 2018), levando à conversão biológica mais eficiente da matéria orgânica complexa em produtos finais da metanogênese, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Por esta razão, a transferência direta de elétrons interespecies tem sido explorada como uma promissora maneira de melhorar os processos de digestão anaeróbia utilizados atualmente.

Algumas bactérias presentes em digestores anaeróbios podem transferir diretamente elétrons gerados durante a fermentação ou oxidação sintrófica de ácidos graxos voláteis para arqueias metanogênicas, as quais aceitam e utilizam esses elétrons durante a metanogênese. Esta produção bacteriana de elétrons ocorre por meio de diversos mecanismos. Por exemplo, Aquino et al. (2005) explicam que microrganismos acetogênicos necessariamente precisam se livrar de elétrons durante a reciclagem das coenzimas NAD<sup>+</sup>. Tais elétrons podem participar na redução de prótons ou ser transferidos para microrganismos receptores.

Durante o processo de DIET, os elétrons extracelulares são transferidos diretamente dos microrganismos doadores para os receptores por meio de nanofios microbianos, pilus e citocromos e também por meio de materiais condutores metálicos e seus óxidos ou outros materiais, como carvão ativado (Kato et al., 2012b; Barua & Dar, 2017). Tais mecanismos de transferência de elétrons entre microrganismos são exemplificados nas Figuras 2(b), 2(c) e 2(d).

A transferência direta de elétrons interespecies foi relatada pela primeira vez em culturas mistas de proteobactérias gram-negativas *Geobacter sulfurreducens* e *Geobacter metallireducens* por Summers et al. (2010). No entanto, algumas bactérias Gram-positivas como diferentes espécies do gênero *Clostridium*, bem como espécies de arqueias, leveduras e microalgas também são capazes de aceitar e doar elétrons através de suas membranas ou paredes celulares (Sydow et al., 2014). Lei et al. (2016) também propõe que espécies de bactérias dos gêneros *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Syntrophomonas* são importantes microrganismos doadores de elétrons envolvidos no processo de DIET. Arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (por exemplo, espécies de *Methanobacterium* e *Methanospirillum*) e acetotróficas (por exemplo, espécies de *Methanosaeta*), responsáveis pela produção de metano em reatores anaeróbios, aceitam e utilizam elétrons doados por bactérias doadoras de elétrons para a metanogênese (Li et al., 2017). Além disso, está bem documentado que a transferência direta de elétrons interespecies está envolvida na acetogênese (Liu et al., 2012), bem como na oxidação do acetato (Yang et al., 2019), sendo atribuídos às famílias *Syntrophaceae*, *Syntrophomonadace-*

ae, *Anaerolineaceae* e ao gênero *Smithella* a relação sintrófica com as arqueias metanogênicas (Wang et al., 2021).

A Tabela 1 apresenta alguns estudos realizados em reatores metanogênicos com o objetivo de identificar microrganismos relacionados a processos de DIET. Apenas alguns destes estudos forneceram evidências diretas de DIET, principalmente com base em culturas puras definidas (co-culturas) de bactérias do gênero *Geobacter* e arqueias pertencentes à ordem *Methanosarcinales*, em especial o gênero *Methanosaeta* (Wang et al., 2021; Rotaru et al., 2014). Muitos estudos, por sua vez, revelam evidências indiretas de DIET, como o enriquecimento das comunidades de algumas espécies de bactérias doadoras e arqueias receptoras de elétrons (Park et al., 2018).

É importante salientar que o tipo do substrato e da adição de material condutor pode influenciar no mecanismo DIET, conforme descrito a seguir.

Destaca-se na Tabela 1 a escolha dos materiais condutores empregados como intermediários em processos de DIET. Materiais basados em carbono (grafite) e em óxido de metais de transição são conhecidos por, em geral, exibirem boa condutividade elétrica a temperatura ambiente. Moléculas de grafite possuem estrutura hexagonal em que apenas três dos quatro elétrons da valência formam ligações covalentes, permitindo, assim, a existência de um elétron deslocalizado que pode se mover livremente entre as camadas de grafite e conduzir eletricidade (Novoselov et al., 2014). Por esta razão, os autores escolheram materiais como fibra de carbono (Lei et al., 2016), nanotubos de carbono (Mostafa et al., 2020) e carvão ativado (Zhao & Zhang, 2019; Yu et al., 2021).

A condutividade elétrica em óxidos de metais de transição, por sua vez, é explicada por meio de diferentes teorias (Rao & Rao, 1970). Uma das hipóteses aceitas é a de que, devido à estrutura cristalina desses materiais, óxidos metálicos, tais como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , possuem íons metálicos de diferentes valências ocupando aleatoriamente alguns dos sítios da célula unitária do cristal, permitindo fácil intercâmbio e condução de elétrons (Tannhauser, 1962). Em função da boa condutividade destes materiais, os autores escolheram  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (Kato et al., 2012a),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Kato et al., 2012a; Li et al., 2015; Im et al., 2019),  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  (Zhou et al., 2022) ou misturas destes óxidos com materiais à base de carbono (Mostafa et al., 2020; Chen et al., 2022) como intermediários em processos de DIET (Tabela 1).

Tabela 1: Microrganismos envolvidos em DIET a partir de diferentes substratos e materiais condutores

Substrato	Bactéria doadora de elétrons	Arqueia receptora de elétrons	Material condutor	Referência
Acetato + Etanol	<i>Geobacter</i> spp.	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanobacterium</i>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Kato et al., 2012a
Etanol	<i>Geobacter metallireducens</i>	<i>Methanotherix harundinacea</i>	-	Rotaru et al., 2014
Butirato	<i>Syntrophomonadaceae</i> <i>Geobacteraceae</i>	<i>Methanosarcinaceae</i> <i>Methanocellales</i> <i>Methanobacteriales</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Li et al., 2015
Lixiviado de aterro sanitário (chorume)	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Streptococcus</i> <i>Syntrophomonas</i>	<i>Methanosarcina</i> . <i>Methanospirillum</i>	Fibra de carbono	Lei et al., 2016
Sacarose	<i>Clostridium sensu stricto</i>	<i>Methanosaeta</i> spp.	Nanofios de anilina	Hu et al., 2017
Glicerol	<i>Pelobacter</i> spp.	<i>Methanosarcina</i> spp.	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Im et al., 2019
Etanol	<i>Petrimonas</i> spp.	<i>Methanosaeta</i>	Carvão ativado granular	Zhao & Zhang, 2019
Ácido oleico	<i>Syntrophomonas zehnderi</i>	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanosarcina</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + nanotubos de carbono	Mostafa et al., 2020
Etanol	<i>Geobacter metallireducens</i>	<i>Methanobacterium</i> strain YSL	-	Zheng et al., 2020
-	<i>Porphyromonadaceae</i> <i>Cloacamonas</i>	<i>Methanobacterium</i>	Carvão ativado + campo elétrico	Yu et al., 2021
-	<i>Bacteroidia</i> <i>Synergistia</i>	<i>Methanomicrobia</i>	NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Zhou et al., 2022
Glicose	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanosarcina</i>	Biocarvão dopado com Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Chen et al., 2022

Nota-se, portanto, que estudos recentes têm determinado os microrganismos e materiais condutores envolvidos nos processos de DIET. Sendo assim, de acordo com Wang et al. (2021), embora uma teoria abrangente e conclusiva sobre a transferência direta de elétrons interespecies ainda não tenha sido estabelecida, seu papel vital na digestão anaeróbia está confirmada. Os autores também afirmam que a literatura atual se concentra principalmente em reatores em batelada, com diferentes inóculos e substratos, enquanto as investigações sobre o efeito da DIET em reatores contínuos ainda estão em fase inicial. Mesmo assim, artigos origi-

nais, como os publicados por Lovley (2017a; 2017b), e *reviews*, como os publicados por Martins et al. (2018) e Wang et al. (2021), já propõem e revisam de forma satisfatória os mecanismos envolvidos na transferência direta de elétrons interespecies.

Além disso, outros estudos têm relatado as formas como a transferência direta de elétrons interespecies estimula a digestão anaeróbia. Estes estudos demonstram que a promoção de DIET por meio da adição de fibras de carbono ou outros materiais condutores, como de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , pode reduzir a fase lag de produção de biogás (Kato et al., 2012b), acelerar o crescimento de arqueias metanogênicas (Park et al., 2018) e tornar mais eficiente a degradação orgânica e produção de  $\text{CH}_4$  (Cruz Viggi et al., 2014).

### 3.2 NANOPARTÍCULAS

Desde meados do século XX, pesquisadores têm estudado e explorado os efeitos dos nanomateriais em diversas áreas. Aplicações industriais de nanotecnologia são, atualmente, comuns e indispensáveis às indústrias de eletrônicos, *hardware*, telecomunicações, farmacêuticas e alimentícias. Destaca-se ainda que, devido à estrutura física única dos nanomateriais, sua capacidade elevada de armazenamento de energia e suas propriedades químicas, tais materiais têm ganhado cada vez mais importância no campo energético (Ganzoury & Allam, 2015).

Neste sentido, o uso de nanomateriais em digestão anaeróbia nos últimos anos têm se mostrado promissor e representa um avanço singular para a produção futura de biogás.

As propriedades únicas dos materiais nanoparticulados permitem que eles atuem como catalisadores nos diversos estágios da digestão anaeróbia, como fonte de nutrientes para os microrganismos envolvidos no processo e também como meio para transferência direta de elétrons entre bactérias sintróficas e arqueias metanogênicas. Por outro lado, dependendo da concentração e composição das nanopartículas, tais aditivos podem causar impactos negativos ao processo de digestão anaeróbia.

Dentre as principais nanopartículas utilizadas em estudos envolvendo digestão anaeróbia, destacam-se aquelas compostas por óxidos de ferro e níquel, incluindo magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ), além de metais zero-valentes, como ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ), que são essenciais para o crescimento microbiano (Tortora et al., 2012).

A Tabela 2 traz os resultados obtidos em estudos que utilizaram nanopartículas de óxidos de ferro e níquel e ferro zero-valente em processos de digestão anaeróbia.

Tabela 2: Efeito de nanopartículas na produção de biogás

Composição das nanopartícula	Diâmetro	Concentração de nanopartículas	Fonte de inóculo	Substrato	Efeito	Referência
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	7 nm	100 mg kg <sup>-1</sup>	Lodo de esgoto	Celulose cristalina	Aumentos 234% na produção de metano	Casals et al., 2014
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	100 – 150 nm	1,75 g g <sup>-1</sup> de sólidos voláteis suspensos	Lodo de esgoto	Propionato	Aumento de 33% na produção de metano	Cruz Viggi et al., 2014
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	7 nm	20 mg L <sup>-1</sup>	Estrume fresco	-	Aumento de 59% na produção de metano	Abdelsalam et al., 2017
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	0,5 g g <sup>-1</sup> de sólidos voláteis suspensos	Lodo e digestato de reator UASB tratando efluente de cervejaria	Glicerol puro	Aumento máximo de 16% na produção de metano	Im et al., 2019
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4,2 nm (raio hidrodinâmico: 79,37 nm)	20 mg L <sup>-1</sup>	Cama de frango	-	Aumento de 73,9% na produção de metano	Aguilar-Moreno et al., 2020
Fe <sup>0</sup>	<50 nm	10 mg g <sup>-1</sup> de sólidos totais suspensos	Lodo ativado residual (WAS)	-	Aumento de 120% na produção de metano	Wang et al., 2016
Fe <sup>0</sup>	9 nm	20 mg L <sup>-1</sup>	Estrume fresco	-	Aumento de 96% na produção de metano	Abdelsalam et al., 2017
Fe <sup>0</sup>	50 – 100 nm	3000 mg L <sup>-1</sup>	Lodo de esgoto	-	Aumento de 108,3% na produção de biogás	Amen et al., 2018
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	46 nm	400 mg kg <sup>-1</sup>	Lodo anaeróbio	Glicose, peptona e extrato de carne	Aumento de 30% na produção de metano	Chen et al., 2018
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	200 – 1000 nm	20 mg L <sup>-1</sup>	Estruco fresco	-	Aumento de 31% na produção de metano	Abdallah et al., 2019
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	~ 20 µm	0,5 g L <sup>-1</sup>	Lodo ativado residual (WAS)	-	Aumento de 27,83% na produção de metano	Zhou et al., 2022



Casals et al. (2014) operaram reatores anaeróbios em batelada, contendo celulose ultrapura como fonte de carbono, sob condições mesofílicas (37 °C), e alcançaram um aumento de 180% na produção de biogás (aumento de 234% na produção de metano), se comparado ao controle. Os autores utilizando 100 mg kg<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (sintetizadas pelos próprios autores), com diâmetro médio de 7 nm, estabilizadas em hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH).

Cruz Viggi et al. (2014) demonstraram que a suplementação com partículas micro-métricas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100-150 nm, sintetizadas pelos próprios autores) aumentou em até 33% a taxa de produção de metano a partir da digestão 6,65 mmol L<sup>-1</sup> de propionato. Neste estudo, o propionato foi escolhido como substrato para avaliação de DIET entre comunidades sintróficas em sistema de energia limitada, isto é, em sistema onde a oxidação de ácidos graxos voláteis em ácido acético e H<sub>2</sub> é termodinamicamente desfavorável. Os pesquisadores concluíram que o efeito estimulante na produção de metano provavelmente é resultado do estabelecimento de transferência direta de elétrons baseada em partículas de magnetita servindo como condutores entre bactérias oxidantes de propionato e arqueias redutoras de dióxido de carbono. O estudo também avaliou a abundância relativa de bactérias e arqueias nos reatores suplementados com magnetita e controles, em amostras colhidas ao final dos testes. Notavelmente, a porcentagem de arqueias (identificadas como espécies de *Methanosaeta*) permaneceu praticamente inalterado nos diferentes reatores controle e suplementados com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (cerca de 40% do total de células).

Wang et al. (2016) obtiveram aumento de 117% na produção de metano durante a digestão anaeróbia de lodo ativado residual (WAS), utilizado 100 mg g<sub>SST</sub><sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemita, óxido de ferro com propriedades semelhante à magnetita) com diâmetro médio inferior a 30 nm (adquiridas de Sigma Aldrich). No mesmo estudo, o uso de 10 mg g<sub>SST</sub><sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sup>0</sup>, com diâmetro médio inferior a 50 nm (Sigma Aldrich), levou ao aumento de 120% na produção de metano durante a digestão anaeróbia de lodo ativado residual (WAS), em condições mesofílicas.

Abdelsalam et al. (2017) obtiveram aumentos significativos de 59 e 96% na produção de metano utilizando, respectivamente, 20 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sup>0</sup> (9 nm) e 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (7 nm) (sintetizadas pelos próprios autores) na digestão anaeróbia mesofílica de esterco bovino. Os autores também observaram redução em 10 dias da fase lag e do tempo necessário para atingir a taxa máxima de produção de biogás, além de verificar efeito bioestimulante sobre microrganismos metanogênicos.

Amen et al. (2018) obtiveram aumentos de 22, 53 e 108% na produção de metano utilizando, respectivamente, 500, 1500 e 3000 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sup>0</sup>, com diâmetro médio de 50 a 100 nm (sintetizadas pelos próprios autores), na digestão anaeróbia de lodo de esgoto (5,4 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>). Os autores concluem que as nanopartículas de Fe<sup>0</sup> deste experimento foram doadoras diretas de elétrons, isto é, que os microrganismos metanogênicos atuaram como oxidantes de ferro, retirando elétrons das nanopartículas para reduzir o dióxido de carbono a metano.

Chen et al. (2018) obtiveram aumento de 30% na produção de metano utilizando 400 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, com diâmetro médio de 46 nm (adquiridas de Sigma Aldrich), na digestão anaeróbia de meio de cultivo sintético sob condições mesofílicas (30°C). Neste estudo o meio de cultivo continha glicose, peptona e extrato de carne, resultando em 1 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>.

Abdallah et al. (2019) obtiveram aumentos de 31%, 29% e 18% na produção de metano utilizando, respectivamente, 20, 70 e 130 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, com diâmetro entre 200 a 1000 nm (sintetizadas pelos autores), na digestão anaeróbia mesofílica de esterco bovino.

Im et al. (2019) investigaram o efeito da adição de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na produção de biogás a partir da digestão do glicerol puro. Neste estudo, os reatores foram inoculados com uma mistura de digestato e lodo granular obtido de um reator UASB para tratamento de efluente de cervejaria e alimentado com glicerol puro em concentrações que variaram de 2,5 a 10 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>. Os reatores foram suplementados com 0,5 gFe/g<sub>SSV</sub> (não há informação sobre origem ou tamanho das partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Os pesquisadores obtiveram aumento máximo de 16% na produção de metano em reatores alimentados com 7,5 g<sub>DQO</sub>, com rendimento de 308 mL-CH<sub>4</sub>/g<sub>DQO</sub> e redução da fase lag em 33%. Nota-se, entretanto, que os reatores teste e controle deste estudo também foram suplementados com outras fontes de nutrientes, como NH<sub>4</sub>Cl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, com o objetivo de atingir razões preestabelecidas de DQO:N:P:Fe.

Aguilar-Moreno et al. (2020) observaram que a digestão anaeróbia da cama de frango (resíduos animais, restos de comida e material de cama) suplementada com 0,02 g L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (sintetizadas pelos autores, estabilizadas com gelatina, diâmetro médio de 4,2 nm e raio hidrodinâmico de 79,37 nm) levou à maior taxa de produção de metano e ao maior rendimento cumulativo de metano, este último com aumento de 73,9% em relação ao controle.

Li et al. (2022) estudaram a capacidade de ímãs comerciais (compostos de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> e SrFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>) e nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Sigma-Audrich, 45 nm) em enriquecer microrganismos

funcionais sem a necessidade de adicionar continuamente materiais condutores a digestores anaeróbios. Os autores concluíram que os ímãs reduziram a fase lag em 51,2% e aumentaram a taxa máxima de produção de metano em 50,1% em comparação com os digestores suplementados com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  livres. Bactérias como *Disulfurimicrobium* e *Geobacter* foram enriquecidas no biofilme formado sobre os ímãs, bem como arqueias do gênero *Methanosaeta*. Evidências de DIET foram proporcionadas pelo enriquecimento da via de redução de  $\text{CO}_2$  ao gênero *Methanosaeta* e pela maior quantidade de genes tipo IV relacionados à formação de pilus por bactérias eletro e quimicamente ativas no biofilme sobre o ímã. Neste mesmo estudo, a adição de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  livres aumentou a produção de metano em 11,3% e reduziu a fase lag em 12,5% quando comparado aos reatores controle. Os pesquisadores utilizaram inóculo obtido de reator anaeróbio semicontínuo e lodo substrato (sem origem definida), sob condições mesofílicas.

Zhou et al. (2022) sintetizaram e utilizaram nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  (aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  (micrômetros), sintetizadas pelos autores) como material condutor para tornar mais eficiente a digestão anaeróbia do lodo ativado residual por meio da promoção de DIET. Como resultado, os pesquisadores obtiveram produção cumulativa de metano e rendimento médio diário aumentados em 27,83% e 17,84%, respectivamente, e taxa de remoção de sólidos voláteis aumentada em 7,67% nos reatores suplementados com nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ . A análise da comunidade microbiana revelou aumento relativo das populações de *Chloroflexi*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, melhorando o desempenho da hidrólise e fornecendo mais substratos para a produção subsequente de metano. Além disso, a maior abundância de microrganismos doadores de elétrons (*Bacteroidia* e *Synergistia*) e microrganismos receptores de elétrons (*Methanomicrobia*) na presença de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  indicaram aumento da produção de metano através da promoção a DIET.

Nota-se que boa parte dos autores citados nos estudos da Tabela 2 sintetizaram as nanopartículas utilizadas em seus estudos. A co-precipitação é o método escolhido para síntese das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ , com exceção de Zhou et al. (2022) que sintetizou partículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  por meio de método hidrotérmico. As nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  foram sintetizadas por meio da redução de íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). Por sua vez, autores como Wang et al. (2016), Li et al. (2022) e Chen et al. (2018) adquiriram suas nanopartículas já sintetizadas. A síntese das nanopartículas em laboratório tem como vantagem a escolha dos materiais estabilizantes, a possibilidade de alteração das rotas de síntese visando a obtenção de partículas com diâmetros específicos, e o menor custo com a compra de reagentes. Por outro lado, a aquisição de nanopartículas de fornecedores qualificados tem como van-

tagem a garantia de homogeneidade, pureza e baixa dispersão de tamanho de partículas, porém a custos mais altos.

Importante observar também a escolha dos substratos utilizados em digestão anaeróbia pelos autores listados na Tabela 2. Parte dos estudos dão preferência à biodigestão de substratos naturais agrícolas, como esterco fresco (Abdelsalam et al., 2017) e cama de frango (Aguilar-Moreno et al., 2020), ou lodo de esgoto (Amen et al., 2018), enquanto outros autores escolheram substratos ultrapuros como celulose microcristalina (Casals et al., 2014), glicerol (Im et al., 2019), propionato (Cruz Viggi et al., 2014) ou glicose e peptídeos (Chen et al., 2018). Entretanto, não foram encontrados estudos que relacionem resíduos industriais reais, como glicerol bruto, com o uso de nanomateriais em digestão anaeróbia.

### 3.2.1 NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA E FERRITA DE NÍQUEL

Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), quando em solução, têm a capacidade de liberar gradualmente os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , os quais são fundamentais em processos intracelulares como replicação de DNA, geração de energia e outras funções vitais (Casals et al., 2014).

Por liberarem gradualmente ferro para o meio, as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  contribuem com o aumento da síntese e atividade de enzimas, coenzimas e outras moléculas essenciais aos processos de digestão anaeróbia. Por exemplo, cofatores ferro-enxofre [Fe-S] são importantes grupos funcionais de enzimas indispensáveis à digestão anaeróbia, tais como a acetil-CoA sintase (Pain & Dancis, 2016). O ferro também é parte fundamental da ferredoxina, molécula que intermedeia a transferência de elétrons em diferentes reações envolvidas na metanogênese acetoclástica (Enzmann et al., 2018).

Além disso, processos de produção de energia nas células bacterianas que envolvam a redução de produção de prótons, como a reciclagem de  $\text{NAD}^+$ , são mediados por enzimas hidrogenases. Das três classes de hidrogenases, duas delas possuem centros catalíticos compostos de metais de transição: [NiFe]-hidrogenase e [FeFe]-hidrogenase (Kumar et al., 2021).  $\text{H}_2$  gerado mediante enzimas hidrogenases são posteriormente utilizados por arqueias no processo de metanogênese hidrogenotrófica.

As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e de outros metais e óxidos metálicos, como visto anteriormente, também facilitam a transferência direta de elétrons interespecíes – DIET durante a metanogênese (Ali et al., 2017). Nanopartículas de ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ), quando em solução, podem liberar gradualmente os íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . O níquel, assim como o ferro, é essencial

à síntese enzimática durante o crescimento das bactérias e arqueias acetoclásticas. Além disso, o níquel tem importante papel na atividade de coenzimas como o fator F<sub>430</sub>, que participa da conversão do substrato em metano durante a metanogênese (Chen et al., 2018).

### 3.2.2 NANOPARTÍCULAS DE FERRO ZERO-VALENTE

O ferro zero-valente (Fe<sup>0</sup>) é um agente redutor relativamente forte frente a uma série de substâncias, tais como íons hidrogênio, carbonatos, sulfatos, nitratos e oxigênio e muitos compostos orgânicos (Pereira & Freire, 2005). Por esta razão, mesmo em meios anóxicos, há uma gradual oxidação do Fe<sup>0</sup> a Fe<sup>2+</sup>, o que também contribui com o aumento da síntese e atividade de enzimas, coenzimas e outras moléculas essenciais aos processos de digestão anaeróbia, conforme descrito anteriormente.

Alguns estudos indicam que as nanopartículas de Fe<sup>0</sup> otimizam a diversidade microbiana e, conseqüentemente, estimulam as etapas hidrolíticas e fermentativas da digestão anaeróbia (Ganzoury & Allam, 2015). Wang et al. (2018) sugeriram que o Fe<sup>0</sup> interage diretamente com as células microbianas, decompondo grupos funcionais dos lipossacarídeos e proteínas das membranas externas dos microrganismos mais suscetíveis. Esse fenômeno de lise leva à liberação de proteínas e outros nutrientes que estimulam o crescimento das populações microbianas resistentes. No entanto, deve-se notar que concentrações muito elevadas podem inibir a metanogênese por meio deste mesmo mecanismo.

Estudos também têm demonstrado que o ferro metálico pode participar efetivamente do processo metanogênico. Palacios et al. (2021) propuseram que bactérias acetogênicas, como as pertencentes à classe *Clostridia*, e arqueias metanogênicas, como as pertencentes ao gênero *Methanobacterium*, interagem mutuamente com o ferro metálico para produzir acetato e metano, conforme descrito pelas equações 8 e 9.



Por fim, a gradual oxidação do Fe<sup>0</sup> a Fe<sup>2+</sup> também produz H<sub>2</sub>, que age como doador de elétrons para arqueias hidrogenotróficas (na Equação 7), aumentando o rendimento da produção de metano. Além disso, nanopartículas e aglomerados de Fe<sup>0</sup> têm a capacidade de participar da transferência direta de elétrons interespecíficas – DIET durante a metanogênese.

### 3.3 GLICEROL BRUTO ORIUNDO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

#### 3.3.1 BIODIESEL NO BRASIL

Desde 1997 o Brasil possui Legislação específica que versa sobre o uso de combustíveis alternativos com potencial para substituição total ou parcial de derivados do petróleo. A Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, ‘dispõe sobre a política energética nacional, as atividades relativas ao monopólio do petróleo, institui o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) e a Agência Nacional do Petróleo (ANP)’.

Dentre os objetivos das políticas nacionais para o aproveitamento racional das fontes de energia, listados no Artigo 1º da Lei nº 9.478/1997, destaca-se o Inciso VIII que propõe a utilização de “fontes alternativas de energia, mediante o aproveitamento econômico dos insumos disponíveis e das tecnologias aplicáveis”.

Com o passar do tempo foi necessário realizar revisões e inclusões com o objetivo de tornar a Lei nº 9.478/1997 mais abrangente em termos de fontes alternativas de energia.

Em 2005, com a promulgação da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro, foi incluído o Inciso XII ao Artigo 1º da Lei nº 9.478/1997, que passa a vigorar com a seguinte redação:

XII – incrementar, em bases econômicas, sociais e ambientais, a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional”.

Com a instituição da Lei nº 11.097/2005 é introduzido o biodiesel na matriz energética brasileira. Fica estabelecido, pela primeira vez, um percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil, a saber, 2% nos primeiros 3 anos após a publicação da Lei e 5% até o ano de 2013.

A Lei nº 11.097/2005 também estabeleceu as definições para “biocombustível” e “biodiesel” por meio da inclusão dos Incisos XXIV e XXV ao Artigo 6º da Lei nº 9.478/1997, que passa a vigorar com a seguinte redação:

XXIV – Biocombustível: combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

XXV – Biodiesel: biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

Em 2011 a Lei 12.490, de 16 de setembro, altera novamente a definição de “biocombustível” do Incisos XXIV do Artigo 6º da Lei nº 9.478/1997, além de estabelecer a definição de “produção de biocombustível” por meio da inclusão do Inciso XXIX ao Artigo 6º da mesma Lei. O novo texto passa a vigorar com as seguintes inclusões:

XXIV – Biocombustível: substância derivada de biomassa renovável, tal como biodiesel, etanol e outras substâncias estabelecidas em regulamento da ANP, que pode ser empregada diretamente ou mediante alterações em motores a combustão interna ou para outro tipo de geração de energia, podendo substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

XXIX – Produção de Biocombustível: conjunto de operações industriais para a transformação de biomassa renovável, de origem vegetal ou animal, em combustível.

A Lei 12.490, de 16 de setembro de 2011, também delineaia novos objetivos à Política Energética Nacional incluindo, entre outros, os seguintes Incisos ao Artigo 1º da Lei nº 9.478/1997, que passa a vigorar com a seguinte redação:

XIII - garantir o fornecimento de biocombustíveis em todo o território nacional.

XIV - incentivar a geração de energia elétrica a partir da biomassa e de subprodutos da produção de biocombustíveis, em razão do seu caráter limpo, renovável e complementar à fonte hidráulica.

XVIII - mitigar as emissões de gases causadores de efeito estufa e de poluentes nos setores de energia e de transportes, inclusive com o uso de biocombustíveis.

As Leis nº 13.033, de 24 de setembro 2014, e nº 13.263, de 23 de março de 2016, estabeleceram novos percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel. As adições graduais e obrigatórias passaram a ser de 1% ao ano, totalizando 10% em 2019.

A Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016 também autorizou o Conselho Nacional de Política Energética – CNPE – a elevar a mistura obrigatória de biodiesel ao óleo diesel em até 15% nos próximos anos.

Em 2018 a Resolução CNPE nº 16, de 29 de outubro de 2018, estabeleceu o cronograma prevendo os percentuais mínimos de adição de biodiesel ao óleo diesel até o ano de 2023 (Tabela 3). Por fim, o Despacho ANP nº 621, de 06 de agosto de 2019, definiu em 11% o percentual mínimo de biodiesel a ser acrescido ao óleo diesel a partir de 1º de setembro de 2019, com projeções de chegar a 15% até 2023.

Tabela 3: Projeção dos percentuais mínimos de adição de biodiesel ao óleo diesel até 2023

Início do incremento percentual da adição de biodiesel	01/09/2019 (Despacho ANP n° 261)	01/03/2020	01/03/2021	01/03/2022	01/03/2023
Percentual mínimo de adição obrigatória	11%	12%	13%	14%	15%

Devido à pandemia de Covid-19 e seus impactos econômicos, como o aumento dos preços globais de commodities e consequente elevação dos preços do biodiesel, os percentuais mínimos de adição não obedeceram aos previstos na Tabela 3 nos últimos dois anos. Entre setembro de 2019 e fevereiro de 2020 o percentual mínimo de adição de biodiesel foi de 11%; entre março e agosto de 2020 foi de 12%; entre setembro e outubro de 2020 foi de 10%; e entre novembro e dezembro de 2020 foi de 11%. Entre janeiro e fevereiro de 2021 foi de 12%; entre março e abril de 2021 foi de 13% e, a partir de abril de 2021, foi de 10%, em volume. Em novembro de 2021, o CNPE, em assessoramento ao Presidente da República, decidiu pela manutenção do teor de 10% de biodiesel no diesel para todo o ano de 2022.

Nota-se que a produção de biodiesel no Brasil esteve em franco aumento por mais de uma década e que tal produção tem capacidade de se tornar ainda maior nos próximos anos, até que se atinja o percentual de adição de até 15% em volume de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, como preconizado pela Resolução CNPE n° 16, de 2018.

Desde novembro de 2008 a Agência Nacional de Petróleo (ANP), produz o Boletim Mensal do Biodiesel, divulgados atualmente na forma de Painel Dinâmico pelo portal gov.br, com o objetivo de difundir as informações relacionadas à atividade de produção e comercialização de biodiesel no Brasil.

A Tabela 4 mostra a evolução do volume de biodiesel produzido no Brasil com base nos Boletins e Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel (ANP, 2022a).

Tabela 4: Produção mensal de biodiesel no Brasil\*

	2008	2012	2016	2018	2020	2021	2022
Produção de biodiesel (m <sup>3</sup> /mês)	80.000	200.000	280.000	340.000	468.000	507.000	458.000
Capacidade nominal autorizada (m <sup>3</sup> /mês)	280.000	560.000	620.000	670.000	774.500	871.200	1.018.000

\* Dados referentes ao mês de janeiro de cada ano



A Tabela 5 apresenta os volumes de biodiesel produzidos e a capacidade nominal autorizada para as regiões do Brasil em março de 2022 (ANP, 2022a).

Tabela 5: Produção de biodiesel por Região (março/2022)

	Nordeste	Norte / Centro-oeste	Sudeste	Sul
Produção de biodiesel (m <sup>3</sup> )	43.670	195.720	34.800	223.240
Capacidade nominal autorizada (m <sup>3</sup> )	103.300	493.000	68.600	405.500

Em março de 2022 existiam 55 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no Brasil, correspondendo a uma capacidade total autorizada de aproximadamente 35.700 m<sup>3</sup>/dia (ANP, 2022a). Destacam-se as regiões Sul e Centro-oeste como as maiores produtoras do Brasil.

### 3.3.2 SÍNTESE DO BIODIESEL

O método mais utilizado atualmente no Brasil para síntese de biodiesel é a reação de transesterificação de triglicerídeos com metanol (ANP, 2022b). Outros processos também podem ser empregados como craqueamento e esterificação.

Nas reações de transesterificação, os triacilglicerídeos reagem com alcoóis produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos (o biodiesel) e glicerol. A transesterificação é uma reação reversível, no entanto, a presença de um catalisador (ácido ou base) contribui para aumentar o rendimento da produção dos ésteres de ácidos graxos, além de acelerar consideravelmente esta conversão (Geris et al., 2007).

A Figura 3 representa uma reação de transesterificação alcalina, onde o álcool utilizado é o metanol e o hidróxido de sódio (NaOH) é o catalisador.

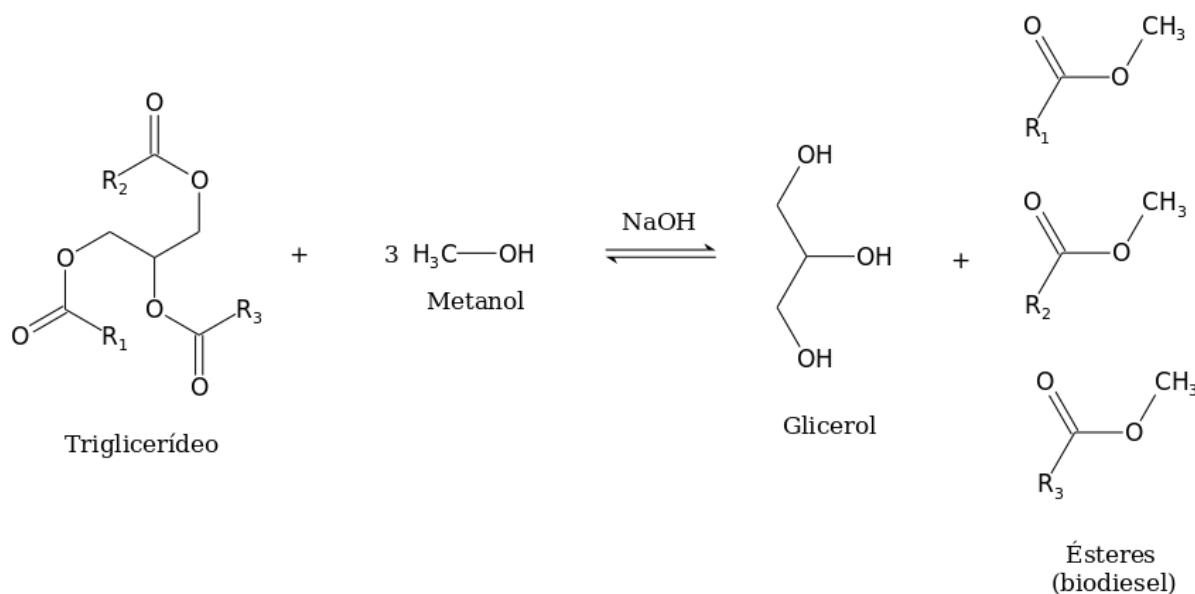


Figura 3: Síntese do biodiesel por meio de transesterificação alcalina

Os triacilglicerídeos utilizados na produção de biodiesel são oriundos de gorduras vegetais ou animais. A fonte destes triacilglicerídeos pode variar consideravelmente dependendo da região do país e da época do ano. A Tabela 6 apresenta as principais fontes de triacilglicerídeo utilizados na produção de biodiesel de acordo com o Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel divulgado pela ANP referente ao mês de março de 2022 (ANP, 2022a).

Tabela 6: Percentual de matéria-prima utilizada na fabricação de biodiesel (março/2022)

	Nordeste	Norte / Centro-oeste	Sudeste	Sul
Óleo de soja	58,8	71,8	15,9	69,4
Gordura bovina	2,4	3,2	28,6	8,1
Óleo de algodão	3,1	2,8	-	-
Outros materiais graxos*	2,7	19,3	5,3	15,3
Óleo de fritura usado	0,4	-	17,3	1,3
Óleo de palma	32,6	1,2	-	-
Outras gorduras animais**	-	1,1	33,0	5,7
Óleo de milho	-	0,5	-	-

\* mistura de matérias-primas tradicionais e reprocessamento de subprodutos da produção de biodiesel

\*\* gordura de porco e de frango

Nota-se que o óleo de soja é a principal matéria-prima para a produção de biodiesel em muitos estados brasileiro. O uso de óleo de milho, palma e outras plantas varia de acordo com as regiões, produtividade das safras e preço internacional das commodities. Gorduras animais como a bovina, suína e de aves também são relevantes para a produção de biodiesel na região sudeste, seguidas pelo óleo de fritura usado e pelo de soja. Destaca-se também que, apesar destes triacilglicerídeos terem origem vegetal ou animal, o metanol utilizados na síntese do biodiesel tem origem petroquímica e, portanto, não-renovável.

### 3.3.3 GLICEROL BRUTO

Como visto anteriormente, houve um expressivo aumento na produção de biodiesel no Brasil nos últimos anos. Em decorrência disso também houve o aumento da geração de efluentes e resíduos comuns ao processo.

O principal resíduo gerado na produção de biodiesel é o glicerol, um material utilizado por diversas indústrias, como a química, farmacêutica, de alimentos, cosmética, dentre outras, porém esse uso está condicionado a um grau de pureza superior a 95% (Wang et al., 2001).

O glicerol proveniente diretamente da produção de biodiesel, ou glicerol bruto, possui quantidades consideráveis de impurezas, dentre elas: metano, sais de sódio e potássio, outros metais, sabões, umidade, ácidos graxos e outros compostos orgânicos (Viana et al., 2012). Tais impurezas estão diretamente relacionadas à matéria-prima utilizada na fabricação do biodiesel (Tabela 6) e influenciam nas características físico-químicas do glicerol bruto, dentre elas: pH, densidade, coloração e demanda de oxigênio.

É necessário que o glicerol bruto seja, portanto, refinado para que possa ser utilizado industrialmente. Eliminar as impurezas do glicerol bruto, entretanto, gera custos e demanda tecnologias específicas, o que torna o refino inviável para pequenos produtores de biodiesel. Além disso, como a produção de glicerol é equivalente a aproximadamente 10% em massa de todo o biodiesel produzido (Yazdani et al., 2007), há também o risco de que a produção de glicerol refinado exceda as demandas internas e externas do produto (Novi et al., 2018). Deste modo, é necessário explorar novas formas de utilização e valorização do glicerol bruto.

### 3.3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL BRUTO

É possível utilizar o glicerol bruto como substrato para a digestão anaeróbia com o objetivo de produzir metano e gerar energia. Viana et al. (2012) concluíram que a digestão anaeróbia

róbia do glicerol bruto é tecnicamente viável, desde que sejam implementadas estratégias operacionais visando aumentar a tolerância dos microrganismos anaeróbios às altas concentrações de matéria orgânica e compostos tóxicos presentes nos glicerol bruto. Os autores afirmam que um reator anaeróbio do tipo UASB tratando diariamente 25 m<sup>3</sup> de glicerol bruto (250 kg<sub>DQO</sub> (m<sup>3</sup>)<sup>-1</sup>) produzirá até 9.600 L de metano por dia, que seriam convertidos em 5,5 GW de calor ou 3,1 GW de eletricidade.

O uso do glicerol bruto como substrato para a digestão anaeróbia com o objetivo de produzir metano é viável porque bactérias fermentadoras têm a capacidade de utilizar o glicerol como fonte de carbono e energia. Além disso, por meio deste processo fermentativo são produzidos ácidos graxos voláteis e álcoois que posteriormente serão convertidos em metano. As vias metabólicas da fermentação anaeróbia do glicerol foram bem estabelecidas por autores como Biebl et al. (1999) e Viana et al. (2012). A Figura 4 ilustra, de forma resumida, como o glicerol é convertido, por meio de vias oxidativas e redutivas, em acetato, propionato, CO<sub>2</sub> e outras moléculas.

Por via redutiva, o glicerol sofre desidratação, mediada pela coenzima glicerol desidratase, produzindo 3-hidroxi-propionaldeído, que por sua vez é reduzido a 1,3-propanodiol, mediado pela enzima 1,3-propanodiol desidrogenase. Por via oxidativa, o glicerol passa por desidrogenação por meio da enzima glicerol desidrogenase, formando diidroxiacetona. Após a fosforilação mediada pela enzima diidroxiacetona quinase, a diidroxiacetona pode ser convertida em piruvato ou em succinato, que posteriormente é convertido em propionato. A partir do piruvato são formados compostos mais simples como 2,3-butanodiol, lactato, butirato, etanol, metanoato, acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. As reações que levam à formação de compostos a partir do piruvato variam de acordo com as condições ambientais, com as bactérias presentes no biodigestor e com as enzimas produzidas por estes microrganismos Viana et al. (2012).

Por fim, álcoois e ácidos graxos produzidos durante a hidrólise e acidogênese são oxidados por bactérias sintróficas a acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, formando o substrato ideal para a metanogênese.

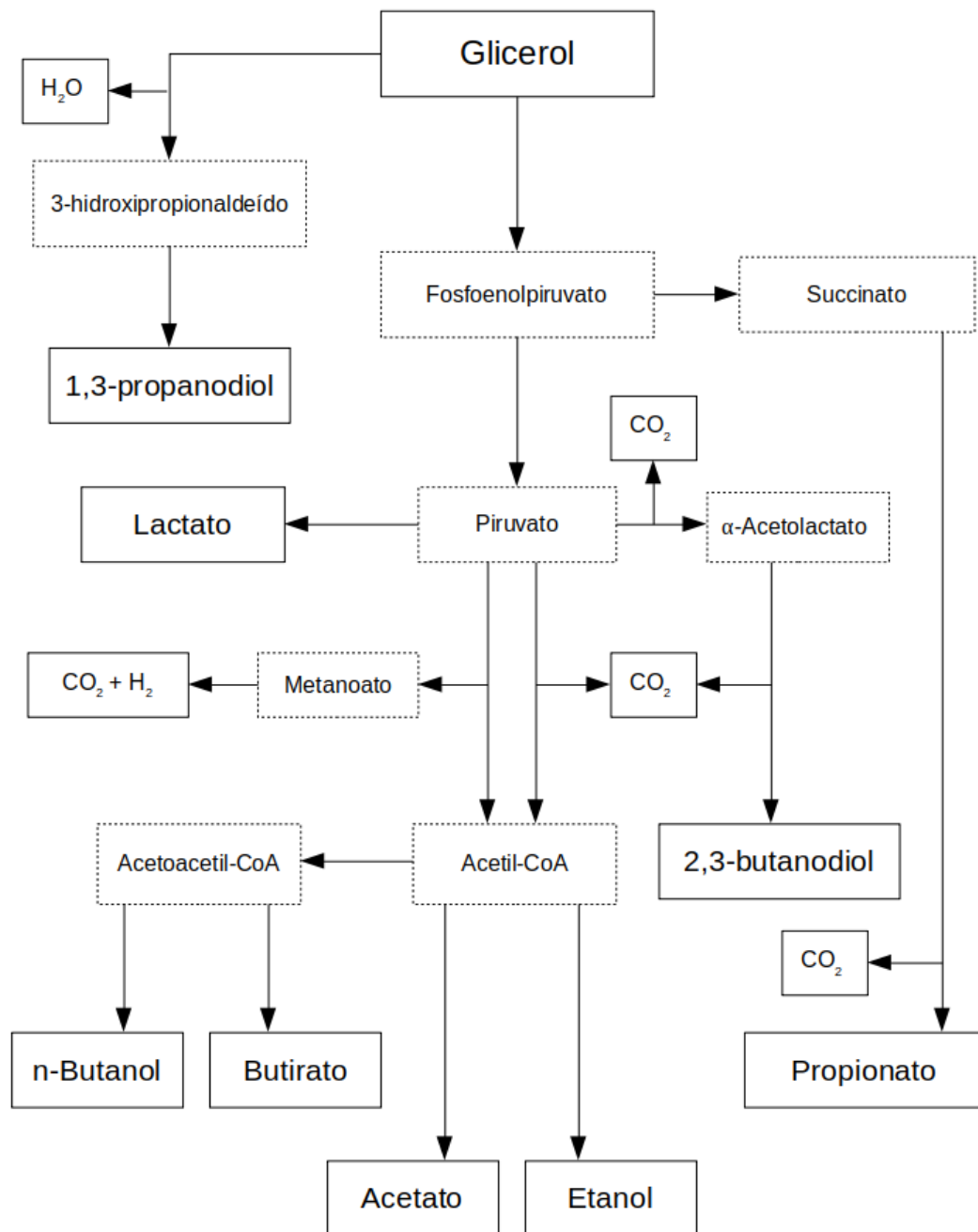


Figura 4: Fermentação do glicerol em compostos mais simples (adaptado de Biebl et al. (1999) e Viana et al. (2012))

Estudos prévios com ênfase em digestão anaeróbia de glicerol bruto estão alistados na Tabela 7.

Tabela 7: Estudos prévios com ênfase em digestão e co-digestão anaeróbia de glicerol bruto

Substrato	Inóculo	Produto	Eficiência	Referência
Glicerol bruto (acidificado)	Lodo granular de tratamento de efluentes de cervejaria	Metano	292 mL $g_{DQO}^{-1}$	Siles López et al. (2009)
Glicerol bruto (purificado)	Lodo granular de tratamento de efluentes de cervejaria	Metano	356 mL $g_{DQO}^{-1}$	Siles López et al. (2009)
Glicerol bruto + Efluente de indústria de biodiesel	Lodo granular de tratamento de efluentes de cervejaria	Metano	310 mL $g_{DQO}^{-1}$	Siles López et al. (2010)
Glicerol bruto	Lodo residual de tratamento de efluentes de indústria de massas alimentícias	Metano	358 mL $g_{DQO}^{-1}$	Baba et al. (2013)
Glicerol bruto	Lodo primário de esgoto	Metano	162 mL $g_{DQO}^{-1}$ (1% de glicerol bruto) 258 mL $g_{DQO}^{-1}$ (3% de glicerol bruto)	Alves et al. (2020)
Glicerol bruto + sobras de alimentos	Lodo primário de esgoto	Metano	130 mL $g_{DQO}^{-1}$ (1% de glicerol bruto) 135 mL $g_{DQO}^{-1}$ (3% de glicerol bruto)	Alves et al. (2022)
Glicerol bruto	Culturas de reator UASB de tratamento de efluente frigorífico	Hidrogênio	0,80 mol $mol_{gluc}^{-1}$	Rodrigues et al, 2019
Glicerol bruto	Cultura mista de sedimentos de fontes termais	Hidrogênio 1,3-propanodiol Etanol	2,05 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> $mol_{GLIC}^{-1}$ 0,36 mol <sub>1,3-PD</sub> $mol_{GLIC}^{-1}$ 0,22 mol <sub>etOH</sub> $mol_{GLIC}^{-1}$	Sittijunda & Reungsang (2020)
Glicerol bruto + esgoto doméstico	Culturas e lodo granular de reator UASB de tratamento de efluente frigorífico	Hidrogênio Metano	10,3 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> dia <sup>-1</sup> 312 L <sub>CH<sub>4</sub></sub> dia <sup>-1</sup>	Adames et al. (2022)

Siles López et al. (2009) avaliaram a digestão anaeróbia do glicerol advindo do processo de produção de biodiesel após tratamento prévio do substrato por destilação a vácuo (para remoção de metanol e umidade), seguida de acidificação (para remoção de hidróxido de potássio – KOH) ou purificação (para remoção de demais impurezas orgânicas). Nestes estudos a digestão anaeróbia ocorreu em digestores em batelada, inoculados com lodo granular de

tratamento de efluentes de cervejaria e atingiram rendimento de produção de  $\text{CH}_4$  de 292 mL  $\text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$  para o glicerol acidificado e 356 mL  $\text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$  para o glicerol purificado (Siles López et al., 2009).

Baba et al. (2013) avaliaram a produção de biogás em um digestor piloto contínuo alimentado com glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel e inoculado com lodo de tratamento de efluentes de indústria de massas alimentícias. Após estabilização do reator piloto, os autores atingiram rendimento máximo de produção de  $\text{CH}_4$  de 358 mL  $\text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$ .

Glicerol bruto também tem sido utilizado na co-digestão anaeróbia de outros substratos, como glicose (Sawasdee et al., 2019) e estrume suíno (Veroneze et al., 2019), com consequente aumento na produção de biogás.

Siles López et al. (2010) estudaram a co-digestão anaeróbia de glicerol e efluentes contendo resíduos de biodiesel, óleos vegetais, glicerol e metanol advindos de indústria de biodiesel em digestores em batelada, inoculados com lodo granular de tratamento de efluentes de cervejaria. Neste estudo de co-digestão os autores atingiram rendimento de produção de  $\text{CH}_4$  de 310 mL  $\text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$ .

Alves et al. (2020) investigaram o efeito da adição de glicerol bruto da produção de biodiesel na digestão anaeróbia em batelada de lodo primário de esgoto. Neste estudo, a adição de 1% ( $\text{vv}^{-1}$ ) de glicerol ao lodo de esgoto elevou a produção de  $\text{CH}_4$  em 62%, de 138,3 mL/ $\text{g}_{\text{VS}}$  no reator controle (apenas lodo de esgoto como substrato) para 223,8 mL/ $\text{g}_{\text{VS}}$ . Os reatores alimentados com 3% ( $\text{vv}^{-1}$ ) de glicerol elevaram a produção de  $\text{CH}_4$  em 167%, de 138,3 mL/ $\text{g}_{\text{VS}}$  no reator controle para 368,8 mL/ $\text{g}_{\text{VS}}$ . Os mesmos autores (Alves et al., 2022) também estudaram o efeito da adição de glicerol bruto da produção de biodiesel na digestão anaeróbia em batelada de lodo primário de esgoto e sobras de alimentos. Neste estudo, a adição de 1% ( $\text{vv}^{-1}$ ) de glicerol à mistura de lodo de esgoto e sobras de alimentos (razão 1:1) elevou a produção de  $\text{CH}_4$  em 45,4%, enquanto a adição de 3% ( $\text{vv}^{-1}$ ) de glicerol elevou a produção de  $\text{CH}_4$  em 122,7%, quando comparados aos reatores controle (apenas lodo de esgoto e sobras de alimentos como substrato).

Outros autores também têm demonstrado a viabilidade da digestão anaeróbia do glicerol bruto na produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol e outros produtos de interesse econômico e ambiental. Rodrigues et al (2019) investigaram a geração de biohidrogênio por meio de culturas mistas e puras obtidas de lodo granular de reator de UASB para tratamento de efluente de abate avícola. Neste estudo foi utilizado glicerol bruto advindo da produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado. Como resultado, os pesquisadores atingiram rendimento

máximo de produção de hidrogênio de 0,80 mol-H<sub>2</sub>/mol-glicerol em reatores acidificados (pH 5,5) alimentados com 20 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup> de glicerol bruto.

Sittijunda & Reungsang (2020) estudaram a produção simultânea de hidrogênio, etanol e 1,3-propanodiol a partir de glicerol bruto ou purificado em digestores anaeróbios contínuos (UASB), sob condições termofílicas, inoculado com cultura mista obtida a partir de sedimentos de fontes termais. Nos reatores alimentados com 62,5 g (L dia)<sup>-1</sup> de glicerol bruto, os pesquisadores obtiveram os seguintes rendimentos de produção: 2,05 mol-H<sub>2</sub>/mol-glicerol; 0,36 mol-1,3-propanodiol/mol-glicerol; 0,22 mol-etanol/mol-glicerol.

Adames et al. (2022) conduziram experimentos em três reatores anaeróbios horizontais em série com leito fixo com o objetivo de avaliar a produção de hidrogênio (fase 1) e metano (fases 2 e 3) por meio da co-digestão de glicerol bruto da produção de biodiesel e esgoto doméstico. Neste experimento, o reator fermentativo para produção de H<sub>2</sub> foi inoculado com inóculo pré-tratado e os reatores metanogênicos foram inoculados com inóculo in natura, ambos obtidos de lodo granular de reator de UASB para tratamento de efluente de abate avícola. Os pesquisadores obtiveram rendimento máximo de produção de hidrogênio de 10,3 mol-H<sub>2</sub>/dia e rendimento máximo de produção de metano de 312,0 e 283,9 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/dia.

Nota-se, por estes e outros estudos, que a geração de biogás e outros produtos de alto valor agregado, utilizando-se glicerol bruto como substrato ou co-substrato para digestão anaeróbia, é algo factível e que deve ser explorado nos próximos anos.

Otimizar o processo de digestão anaeróbia de glicerol bruto, por meio de nano-aditivos, por exemplo, e integrá-lo à agroindústria e às indústrias alimentícias e do biodiesel são formas de tornar a matriz energética brasileira mais diversificada, eficiente e sustentável. Como exemplificado na Figura 5, a digestão anaeróbia do glicerol bruto pode ser integrada ao ciclo de produção do biodiesel, promovendo biorremediação de resíduos potencialmente nocivos ao ambiente e fornecendo energia por meio do biogás.



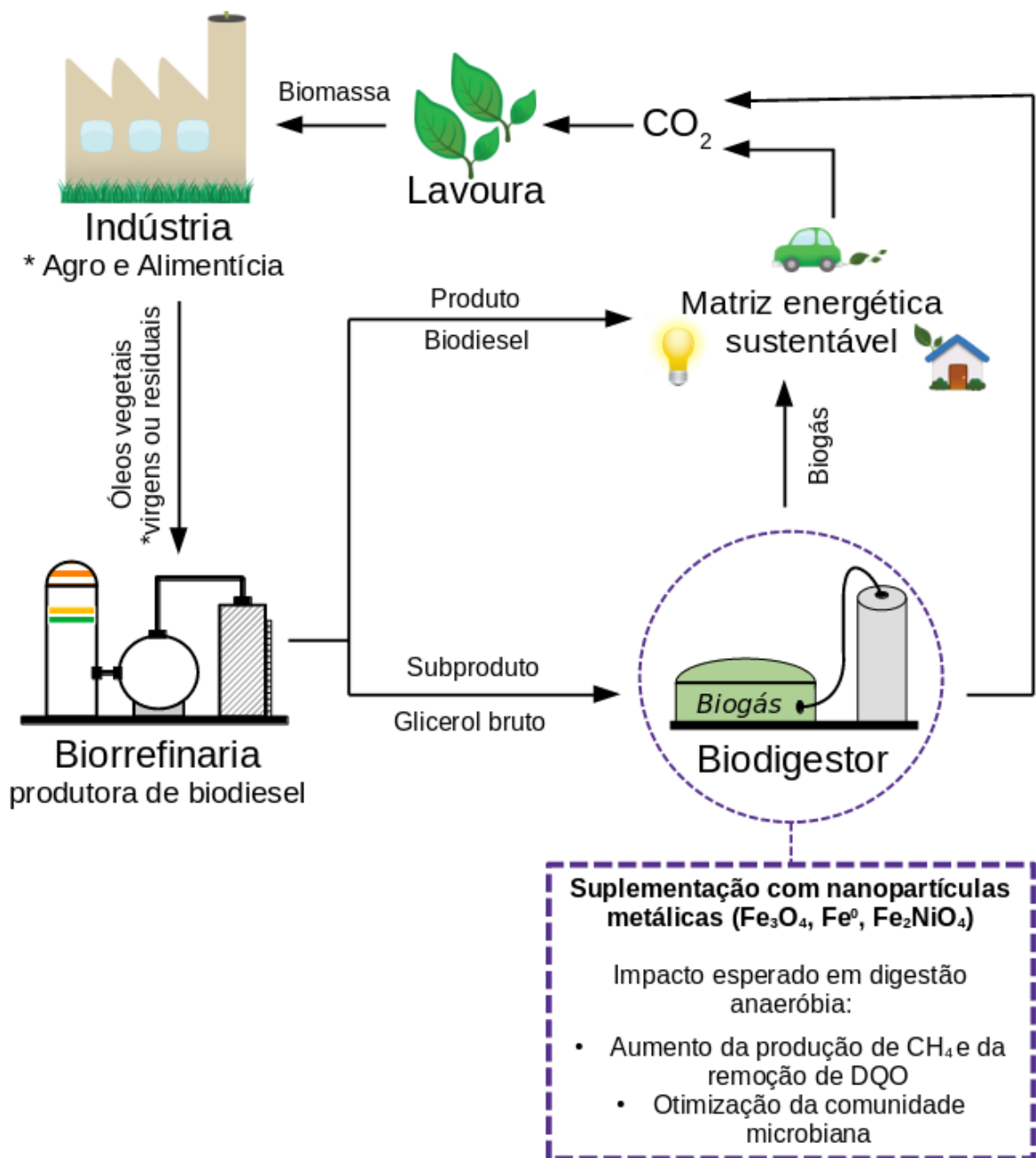


Figura 5: Otimização e integração da digestão anaeróbia de glicerol à indústria e matriz energética brasileira

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ETAPAS EXPERIMENTAIS

Os experimentos realizados durante este estudo foram divididos em quatro etapas, conforme descrito a seguir.

A primeira etapa envolveu a determinação do método de síntese das nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) e a análise e caracterização das nanopartículas.

Na segunda etapa foram realizados testes preliminares para determinação dos parâmetros a serem utilizados nos reatores anaeróbios em batelada. Foram determinadas as quantidades ideais de inóculo e solução tampão a ser utilizados nos reatores.

Durante a terceira etapa foram realizados os ensaios de produção de biogás em reatores anaeróbios em batelada operando com diferentes concentrações de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ). Nesta etapa foi realizado o acompanhamento da produção de metano, composição do biogás, remoção de DQO e evolução do pH.

Por fim, na quarta etapa foi verificado o efeito da adição das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e do glicerol bruto sobre a comunidade microbiana presente nos reatores por meio da identificação dos consórcios em amostra do inóculo utilizado e amostra do reator alimentado com glicerol bruto e suplementado de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 4.2 ETAPA 1 – NANOPARTÍCULAS

#### 4.2.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) foram sintetizadas de acordo com o método da coprecipitação proposto por Massart (1981), com modificações, a saber: inclusão da etapa de estabilização com citrato e substituição do íon  $\text{Fe}^{2+}$  por  $\text{Ni}^{2+}$  para realização da síntese de ferrita de níquel.

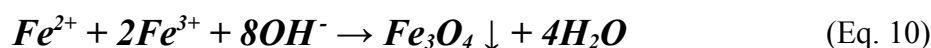
As nanopartículas de ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) foram sintetizadas de acordo com o método de redução por borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) proposto por Sun et al. (2006), com modificação, a saber: inclusão da etapa de estabilização com citrato.

Com o objetivo de reduzir a agregação de partículas e formar uma solução coloidal estável, as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  foram recobertas com citrato, de acordo com o método utilizado por Andreas et. al (2012).

As **nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )** foram sintetizadas pelo método da coprecipitação dos íons ferroso e férrico ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , respectivamente) em meio básico, juntamente ao recobrimento das partículas com citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ), visando reduzir a agregação das mesmas.

Em um Erlenmeyer foram dissolvidos em água deionizada os sais sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) em quantidades suficientes para se obter a proporção estequiométrica 1:2 entre os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , respectivamente, a saber: 6,95 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 13,52 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , diluídos em 250 mL de água deionizada. A esta solução também foi adicionado 0,5 mols de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) para cada mol de íons  $\text{Fe}^{2+}$ , isto é, 2,40 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ .

A precipitação das nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ocorreu, em seguida, com a adição, sob agitação e em atmosfera inerte de nitrogênio ( $\text{N}_2$ , 99%), de solução 0,5M de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) até atingir-se pH final igual a 12. Tal precipitação ocorreu de acordo com a Equação 10:



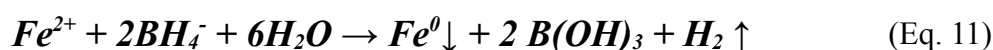
Após a completa reação foi obtida uma solução coloidal de cor preta de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Com uma barra magnética foi realizada a separação das partículas e descarte do sobrenadante. Após separação magnética do material, o mesmo foi lavado três vezes com água deionizada e ressuspensão em 1 L de água deionizada (concentração teórica:  $\approx 5,78 \text{ gFe}_3\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ ). Após a ressuspensão foi realizada a determinação da concentração de nanopartículas pelo método da 1,10-fenantrolina, descrito no item 4.5.2.

As **nanopartículas de ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ )** foram sintetizadas pelo método da redução de íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), juntamente ao recobrimento das partículas com citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ), visando reduzir a agregação das mesmas.

Em um Erlenmeyer foi dissolvido em água deionizada o sal sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a saber: 6,95 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 250 mL de água deionizada. A esta so-

lução também foi adicionado 0,1 mols de ácido cítrico para cada mol de íons  $Fe^{2+}$ , isto é, 0,48 g de  $C_6H_8O_7$ .

A precipitação das nanopartículas de ferro zero-valente ( $Fe^0$ ) ocorreu, em seguida, com a lenta adição, sob agitação manual e em atmosfera inerte de nitrogênio ( $N_2$ , 99%), de solução 0,2M de  $NaBH_4$ , em excesso (2,36 g de  $NaBH_4$  diluídos em 300 mL de água deionizada). Tal precipitação ocorre de acordo com a Equação 11:

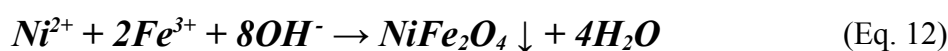


Após a completa reação foi obtida uma suspensão de cor preta de nanopartículas de ferro zero-valente ( $Fe^0$ ). Com uma barra magnética foi realizada a separação das partículas e descarte do sobrenadante. Após separação magnética do material, o mesmo foi lavado três vezes com água deionizada e ressuspenso em 500 mL de água deionizada (concentração teórica:  $\approx 2,8 \text{ gFe}^0 \text{ L}^{-1}$ ). Após a ressuspensão foi realizada a determinação da concentração de nanopartículas pelo método da 1,10-fenantrolina, descrito no item 4.5.2.

As **nanopartículas de ferrita de níquel ( $NiFe_2O_4$ )** foram sintetizadas pelo método da coprecipitação dos íons  $Ni^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  em meio básico, juntamente ao recobrimento das partículas com citrato ( $[C_6H_5O_7]^{3-}$ ), visando reduzir a agregação das mesmas.

Em um Erlenmeyer foram dissolvidos em água deionizada os sais cloreto de níquel hexahidratado ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ) e cloreto férrico hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) em quantidades suficientes para se obter a proporção estequiométrica 1:2 entre os íons  $Ni^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , respectivamente, a saber: 5,95 g de  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  e 13,52 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , diluídos em 250 mL de água deionizada. A esta solução também foi adicionado 0,5 mols de ácido cítrico para cada mol de íons  $Ni^{2+}$ , isto é, 2,40 g de  $C_6H_8O_7$ .

A precipitação das nanopartículas de ferrita de níquel ( $NiFe_2O_4$ ) ocorreu, em seguida, com a adição, sob agitação e em atmosfera inerte de nitrogênio ( $N_2$ , 99%), de solução 0,5M de  $NaOH$  até atingir-se pH final igual a 12. Tal precipitação ocorre de acordo com a Equação 12.



Após a completa reação obteve-se uma solução coloidal de cor marrom de ferrita de níquel ( $NiFe_2O_4$ ). Por não ser uma substância ferromagnética, as nanopartículas de  $NiFe_2O_4$

não foram separadas com o auxílio de ímã. Por esta razão, a solução foi centrifugada a 7500 RPM, a temperatura ambiente, por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após a separação do material, o mesmo foi ressuspense em 1 L de água deionizada (concentração teórica:  $\approx 5,86 \text{ g NiFe}_2\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ ). Após a ressuspensão foi realizada a determinação da concentração de nanopartículas pelo método da 1,10-fenantrolina, descrito no item 4.5.2.

#### 4.2.2 CARACTERIZAÇÃO

A concentração das soluções de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) foi obtida pelo método colorimétrico da 1,10-fenantrolina (descrito em no item 4.5.2) (APHA, 2005).

A caracterização química e estrutural das nanopartículas foi realizada, respectivamente, pelos métodos de Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ambas em microscópio eletrônico de varredura ZEISS, modelo Sigma, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP. Para realização das análises de MEV e EDS as soluções de nanopartículas foram secas por 24 horas, em estufa a  $60^\circ\text{C}$ , e depois maceradas em cadinho de cerâmica até a obtenção de um pó fino homogêneo.

A determinação do tamanho dos aglomerados de nanopartículas foi realizada pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês Dynamic Light Scattering) em equipamento DLS Malvern, modelo Zetasizer, localizado no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CTBE/CNPEM. Para realização das análises de DLS foram utilizadas as soluções de nanopartículas, sem prévia secagem.

#### 4.3 ETAPA 2 – TESTES PRELIMINARES

Os testes preliminares foram realizados em reatores anaeróbios em batelada, com adições de substrato e inoculo, conforme descritos a seguir.

#### 4.3.1 INÓCULO

Foi utilizado lodo granular proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente – UASB (do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) – para tratamento de efluentes de abate avícola. O lodo granular anaeróbio foi obtido no abatedouro Avícola Dacar em Tietê-SP. Após a coleta, o lodo foi mantido sob refrigeração a 4°C.

A caracterização do lodo granular anaeróbio incluiu a determinação dos teores de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF), de acordo com APHA, 2005. Além da determinação de ferro total pelo método da 1,10-fenantrolina (APHA, 2005) descrito no item 4.5.2.

#### 4.3.2 SUBSTRATO

Foi utilizado glicerol bruto – subproduto da fabricação de biodiesel por processo de transesterificação de óleos por meio de metanol e hidróxido de sódio. O glicerol bruto foi cedido pela empresa Oleoquímica Biobrotas em Brotas-SP.

As características físico-químicas do glicerol bruto eram: demanda química de oxigênio: 1,92 kg<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>; teor de glicerol: 80,6%; pH 4,35; teor de cloretos: 5,3%; teor de umidade: 11,4%; teor de cinzas: 5,1%; teor de matéria orgânica (exceto glicerol): 2,84%.

#### 4.3.3 TESTE 1 – TAMPONAMENTO

Foram testadas quatro soluções tampão distintas, conforme descrito a seguir, para os reatores anaeróbios em batelada.

Foram produzidas duas soluções de fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) nas concentrações 3,0 gK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> e 6,0 gK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>. A estas soluções foi adicionado fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) até que se produzisse uma solução tampão de pH igual a 7,3.

Também foram produzidas duas soluções de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) nas concentrações 3,0 gNaHCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e 6,0 gNaHCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. A estas soluções foi adicionado fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) até que se produzisse uma solução tampão de pH igual a 7,3.

A seguir, foram montadas duplicatas de reatores anaeróbios em batelada contendo as soluções tampão, conforme descrito anteriormente. Cada reator de 500 mL (250 mL de volume reacional) continha, além da solução tampão, 50 mL de lodo granular (2,25 g<sub>STV</sub>) e glicerol bruto (15 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>). O pH de cada reator foi ajustado em 7,8 e o *headspace* foi preenchido com

$N_2$  (99%,9) sob fluxo constante durante 10 minutos. Água deionizada foi adicionada aos reatores até completar o volume líquido de 250 mL. A seguir os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica, mantidos a 37°C, sob modo estático e operados durante 200 horas.

A solução tampão com maior capacidade tamponante foi a escolhida para ser adicionada ao teste descrito a seguir.

#### 4.3.4 TESTE 2 – QUANTIDADES DE INÓCULOS

Foi testada a quantidade ideal de inóculo a ser utilizado nos reatores anaeróbios em batelada, após a escolha da solução tampão ideal.

Duplicatas de reatores anaeróbios em batelada foram montados com 50 e 100 mL de lodo granular anaeróbio (2,25 e 4,5  $g_{STV}$ , respectivamente). Cada reator de 500 mL (250 mL de volume reacional) continha, além do lodo granular, solução tampão (6,0  $gNaHCO_3 L^{-1}$ ) e glicerol bruto (15  $g_{DQO} L^{-1}$ ). O pH de cada reator foi ajustado em 7,8 e o *headspace* foi preenchido com  $N_2$  (99,9%) sob fluxo constante durante 10 minutos para efetuar a troca gasosa e proporcionar as condições anaeróbias. A seguir os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica, mantidos a 37°C, sob modo estático e operados durante 200 horas.

A condição com a quantidade de inoculo que apresentou produções mais elevadas de biogás foi escolhida para a montagem dos reatores com adição de nanopartículas de  $Fe_3O_4$ ,  $Fe^0$ ,  $NiFe_2O_4$ , como descrito a seguir na etapa 3.

#### 4.4 ETAPA 3 – ENSAIOS COM ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Os reatores anaeróbios em batelada foram montados para as diferentes concentrações de nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), ferro zero-valente ( $Fe^0$ ) e ferrita de níquel ( $NiFe_2O_4$ ).

Para cada tipo de nanopartícula ( $Fe_3O_4$ ,  $Fe^0$ ,  $NiFe_2O_4$ ) foi realizada uma série de 4 ensaios sob condições mesofílicas (36 – 38 °C) com variações nas concentrações de nanopartículas. Foram montadas duplicatas de reatores anaeróbios em batelada em frascos Duran de 500 mL contendo: 50 mL de lodo granular anaeróbio (2,25  $g_{STV}$ ); glicerol bruto (variando de 25 a 35  $g_{DQO} L^{-1}$  de acordo com a série de ensaios); solução tampão bicarbonato ( $NaHCO_3$ : 6,0  $g L^{-1}$ ); nanopartículas de  $Fe_3O_4$ ,  $Fe^0$  ou  $NiFe_2O_4$  previamente sintetizadas nas concentrações ( $mg L^{-1}$ ): 200; 400 ou 800; água deionizada suficiente para atingir volume reacional de

250 mL. O pH de cada reator foi ajustado por meio de gotejamento de soluções concentradas de HCl (1M) ou NaOH (1M) até atingir o intervalo entre 7.8 a 8.0. O *headspace* dos reatores foi preenchido com N<sub>2</sub> (99,9%) sob fluxo constante durante 10 minutos para proporcionar as condições de anaerobiose. Os reatores foram então fechados com tampa de borracha e rosca plástica e mantidos a 37°C até a estabilização da produção de biogás. Foi realizada agitação manual dos reatores a cada 24 horas. Reatores controle foram montados sem adição de nanopartículas, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Durante a operação, ou seja, no início e após 7 e 14 dias, foram sacadas alíquotas de 5 mL de meio reacional para acompanhamento do pH e das remoções de DQO. Os volumes produzidos de biogás foram quantificados a cada 24 horas nos primeiros 5 dias da operação, e a cada 48 h nos períodos seguintes.

A Tabela 8 apresenta, de forma sintetizada, os parâmetros padronizados após os testes preliminares para a montagem dos reatores anaeróbios em batelada utilizados nos ensaios para produção de biogás.

Tabela 8: Parâmetros padronizados para os reatores anaeróbios em batelada

<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Padronização</b>
Lodo granular	50 mL	≈ 2,25 g <sub>STV</sub>
Glicerol Bruto	25 – 35 g <sub>DQO</sub> L <sup>-1</sup>	
Solução tampão (NaHCO <sub>3</sub> )	6 gNaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	pH=7,3 (solução)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sup>0</sup> ou NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0, 200, 400 ou 800 mg L <sup>-1</sup>	
Volume reacional	250 mL	Volume completo com água deionizada
pH inicial	7.8 – 8.0	Reatores
Temperatura de operação	36.0 – 38.0 C°	
Atmosfera	N <sub>2</sub> (99%)	Fluxo constante por 10 min.

## 4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS

### 4.5.1 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)



As determinações de demanda química de oxigênio foram realizadas de acordo com o método padrão estabelecido pela *American Public Health Association* (APHA, 2005).

Alíquotas de 1,25 mL de amostra previamente diluída (concentração estimada: 100 – 800 mg L<sup>-1</sup>) foram adicionadas a 0,75 mL de solução de digestão à base de sulfato de mercúrio dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0,035 M) e 1,75 mL de solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata (10,12 g de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 1 L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%)). A seguir as amostras foram colocadas em termobloco digestor de DQO, marca Macherey-Nagel, modelo Nanocolor Vario C2, durante 2 horas a 150°C. Após a digestão, determinou-se a absorção de luz visível (comprimento de onda: 620 nm) em espectrofotômetro digital, marca Biospectro, modelo SP-22. A curva de calibração utilizada nestas análises está ilustrada no Anexo 1.

#### 4.5.2 FERRO TOTAL

As determinações de ferro total em solução foram realizadas de acordo com o método padrão estabelecido pela *American Public Health Association* (APHA, 2005).

Em balão volumétrico de 50 mL, alíquotas de 5,0 mL de amostra previamente diluída (concentração estimada: 1 – 4 mg L<sup>-1</sup>) e digerida em ácido clorídrico (HCl, 1 M) sob temperatura ambiente, foram adicionadas a 2,5 mL de solução redutora de cloridrato de hidroxilamina a 10% (m/v), 2,5 mL de solução de 1,10-fenantrolina a 0,25% (m/v), 5,0 mL de solução tampão de acetato de sódio e ácido acético (1,0 M) e água deionizada até completar o volume. Aguardou-se 15 minutos para desenvolvimento de cor e, em seguida, determinou-se a absorção de luz visível (comprimento de onda: 510 nm) em espectrofotômetro digital, marca Biospectro, modelo SP-22. A curva de calibração utilizada nestas análises está ilustrada no Anexo 2.

Para a determinação das concentrações de ferro total nas soluções de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sup>0</sup>, NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, alíquotas de 1 mL de cada solução coloidal (descritas no item 4.2.1) foram digeridas por 2 horas em 5 mL de ácido clorídrico (HCl, 1M), sob temperatura ambiente para completa solubilização do ferro. Após a digestão, procedeu-se com as diluições para que se atingisse concentração estimada de 1 a 4 mg-Fe L<sup>-1</sup>. Após a diluição, realizaram-se as preparações das amostras e, em seguida, as análises colorimétricas, conforme descrito anteriormente.

Para a determinação das concentrações de ferro total no lodo granular anaeróbico, amostras de 0,3 g de lodo previamente seco em estufa (80°C, por 24 horas) foram digeridas por 2 horas em 5 mL de ácido clorídrico (HCl, 1M), sob temperatura ambiente, para completa

solubilização do ferro. Após a digestão, procedeu-se com as diluições para que se atingisse concentração estimada de 1 a 4 mg-Fe L<sup>-1</sup>. Após a diluição, realizaram-se as preparações das amostras e, em seguida, as análises colorimétricas, conforme descrito anteriormente.

#### 4.5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS VOLUMES DE BIOGÁS PRODUZIDOS

Os volumes de metano foram quantificados pelo método de deslocamento de volume líquido de acordo com método experimental proposto por Aquino et al. (2007), conforme a Figura 6.

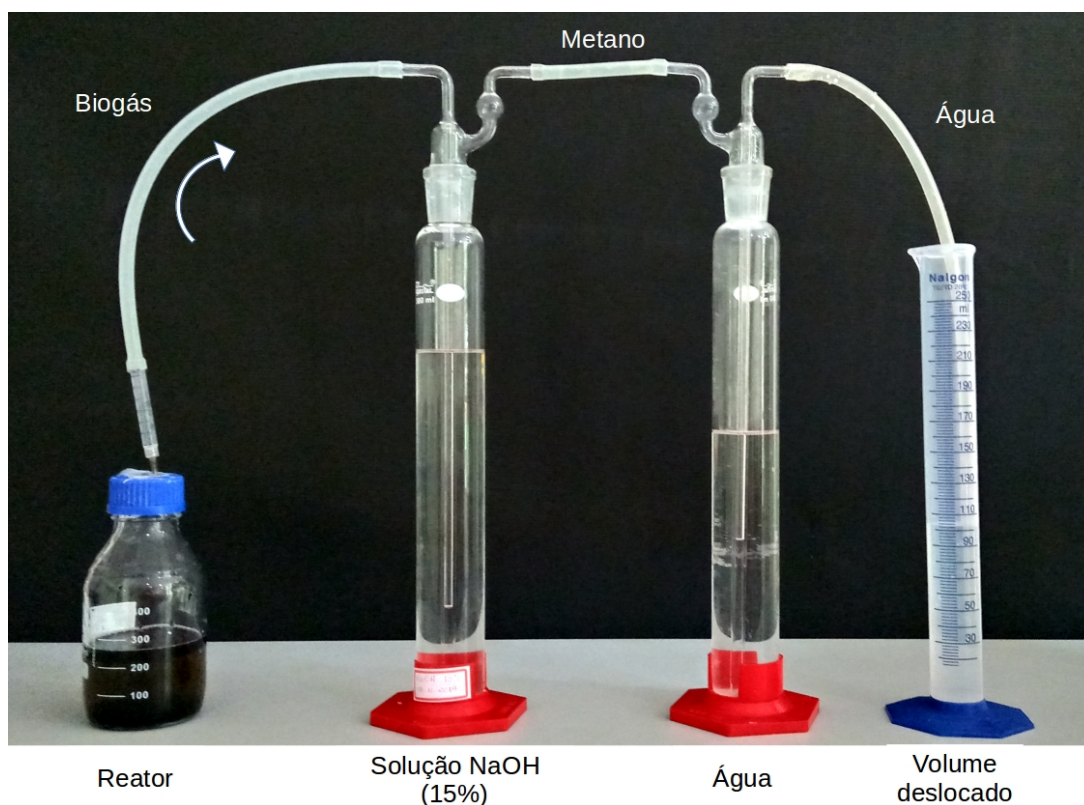


Figura 6: Método para quantificação de volume de metano produzido. Adaptado de Aquino et al. (2007)

A quantificação dos volumes produzidos de metano foi realizada através do deslocamento de volume de água, após lavagem do biogás em solução de hidróxido de sódio (NaOH) com concentração de 15% para remoção do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A ligação entre o reator e o sistema foi realizada por uma agulha com todas as suas junções vedadas com silicone para evitar o vazamento do gás.

Os volumes produzidos de biogás foram quantificados a cada 24 horas nos primeiros 5 dias da operação, e a cada 48 h nos períodos seguintes.

#### 4.5.4 QUANTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DE BIOGÁS NO HEADSPACE

Metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) foram determinados em cromatógrafo à gás Shinadzu, modelo GC-2014. Volumes de 30 µL foram eluídos por coluna Carboxen 1010 Plot, 30 m x 0,53 mm, e as frações gasosas foram identificadas por detector de condutividade térmica – TCD.

Argônio foi usado como gás de arraste (3,0 mL min<sup>-1</sup>). O detector TCD e o injetor foram ajustados a 230°C. A programação do forno foi de 120°C (1,0 min), taxa de aquecimento de 40°C min<sup>-1</sup> (2,0 min) até 200°C (3,0 min), seguido de aquecimento de 50°C min<sup>-1</sup> (0,5 min) até 230°C (0,6 min). As curvas de calibração para H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> estão ilustradas no Anexo 3.

#### 4.5.5 AJUSTE DE DADOS AO MODELO DE GOMPERTZ

Os dados experimentais referentes à produção de biogás foram determinados pelo método de deslocamento de volumes descrito acima. Tais dados foram ajustados ao modelo matemático de Gompertz (modificado), descrito pela Equação 13. Para isso, foi utilizado o software livre de plotagem de gráficos científicos e análise de dados QtiPlot.

$$P(t) = A e^{\left( -e^{\left( 1 + \frac{Re(L-t)}{A} \right)} \right)} \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde,

t: tempo (h);

P(t): produção acumulada de biogás por grama de sólidos totais voláteis (mL gSTV<sup>-1</sup>), em função do tempo;

A: potencial de produção de biogás (mL gSTV<sup>-1</sup>);

R: taxa máxima de produção de biogás ( $\text{mL (gSTV h)}^{-1}$ );  
 L: fase inicial (lag) para produção de biogás (h);  
 e: número e,  $\approx 2,718$  (adimensional).

A evolução temporal das taxas de produção de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL (gSTV h)}^{-1}$ ) foram obtidas por meio da diferenciação da função ajustada pelo modelo matemático de Gompertz modificado, tal como descrito pela Equação 14. Para tanto, foi utilizado o software livre de plotagem de gráficos científicos e análise de dados QtiPlot.

$$T(t) = \frac{dP(t)}{dt} \quad (\text{Eq. 14})$$

Onde,

T(t): taxa de produção de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL (gSTV h)}^{-1}$ ), em função do tempo;

P(t): produção acumulada de biogás por grama de sólidos totais voláteis ( $\text{mL gSTV}^{-1}$ ), em função do tempo.

Os instantes (tempo) em que ocorreram as máximas produções de biogás para cada ensaio foram determinados a partir da solução da equação 15 (segunda derivada de P(t)), por meio da qual são calculados os pontos de inflexão dos dados ajustados ao modelo matemático de Gompertz modificado. Tais soluções também foram obtidas utilizando-se o software livre de plotagem de gráficos científicos e análise de dados QtiPlot.

$$\frac{d^2 P(t)}{dt^2} = 0 \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde,

t: tempo (h)

P(t): produção acumulada de biogás por grama de sólidos totais voláteis ( $\text{mL gSTV}^{-1}$ ), em função do tempo.

#### 4.6 ETAPA 4 – IDENTIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DOS CONSÓRCIOS ANAERÓBIOS

O efeito das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre a comunidade microbiana presente nos reatores alimentados com glicerol bruto foi avaliada por meio da identificação em larga escala dos consórcios (Plataforma Illumina). As amostras identificadas foram: (1) inóculo e (2) reator alimentado com glicerol bruto e suplementado com 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> após 170 horas de operação.

A identificação das comunidades microbianas das amostras (1) e (2) compreendeu: extração de DNA genômico (Griffiths et al., 2000), seguido de pré-processamento e análise metagenômica (Caporaso et al., 2010).

A extração do DNA foi realizada com fenol-clorofórmio de acordo com Griffiths et al. (2000), com modificações (fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v)). Após a extração do DNA, a amostra passou por secagem em temperatura ambiente por 24 horas e posterior armazenamento a 20 °C negativos. Em seguida, foi realizada a reação em cadeia da polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para posterior identificação em larga escala e análises de bioinformática. A qualidade e integridade das amostras de DNA extraídas foram determinadas usando um espectrofotômetro ND-2000 (NanoDrop Inc., Wilmington, DE).

O sequenciamento foi realizado usando o conjunto de primers específico 515F: 5'-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGG-3' e 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' para marcar a região V4 do gene 16S rRNA por GeneAmp PCR System (empresa ABI, EUA). As leituras em pares foram atribuídas às amostras com base em seu código de barras exclusivo e truncadas cortando o código de barras e a sequência de primers. As leituras em pares foram mescladas usando FLASH (V1.2.7).

A filtragem de qualidade nas tags brutas foi realizada sob condições de filtragem específicas para obter as tags limpas de alta qualidade de acordo com o processo de controle de qualidade QIIME (V1.7.0). As tags foram comparadas com o banco de referência (banco de dados Gold) usando o algoritmo UCHIME para detectar sequências de quimeras e, em seguida, as sequências de quimeras foram removidas. Assim, as tags efetivas foram finalmente obtidas. A análise das sequências foi realizada pelo software Uparse (Uparse v7.0.1001).

Sequências com similaridade  $\geq 97\%$  foram atribuídas às mesmas unidades taxonômicas operacionais – OTU (*Operational Taxonomic Units*) equivalentes à espécie. Para cada sequência representativa, foi utilizado o banco de dados GreenGene baseado no classificador RDP (Versão 2.2). A fim de estudar a relação filogenética de diferentes OTUs e a diferença dos gê-

neros dominantes em diferentes amostras, o alinhamento de múltiplas sequências foi realizado usando o software MUSCLE (Versão 3.8.31).

As informações de abundância de OTU foram normalizadas usando um padrão de número de sequência correspondente à amostra com menos sequências. Análises subsequentes da diversidade Alfa foram realizadas com base nesses dados normalizados de saída. A diversidade Alfa foi aplicada na análise de complexidade da diversidade de espécies por meio dos índices de Shannon e Chao-1, calculados com o auxílio do software QIIME (Versão 1.7.0) e exibidos com software R (Versão 2.15.3). As sequências foram depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), sob os seguintes números de acesso: SRR14252429 (inoculo) e SRR15431019 (amostra do reator).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Com a realização das sínteses, foram obtidas soluções coloidais de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  de aspectos semelhantes ao mostrado na Figura 7(a).

A Figura 7 refere-se especificamente às nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas com citrato, sintetizadas de acordo com o método da coprecipitação descrito no item 4.2.1. A Figura 7(a) mostra o comportamento da solução coloidal em processo de separação magnética. A Figura 7(b) apresenta o aspecto do pó de nanopartículas obtido após a secagem do material. As Figuras 7(a) e (b) ilustram a forte atração magnética das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

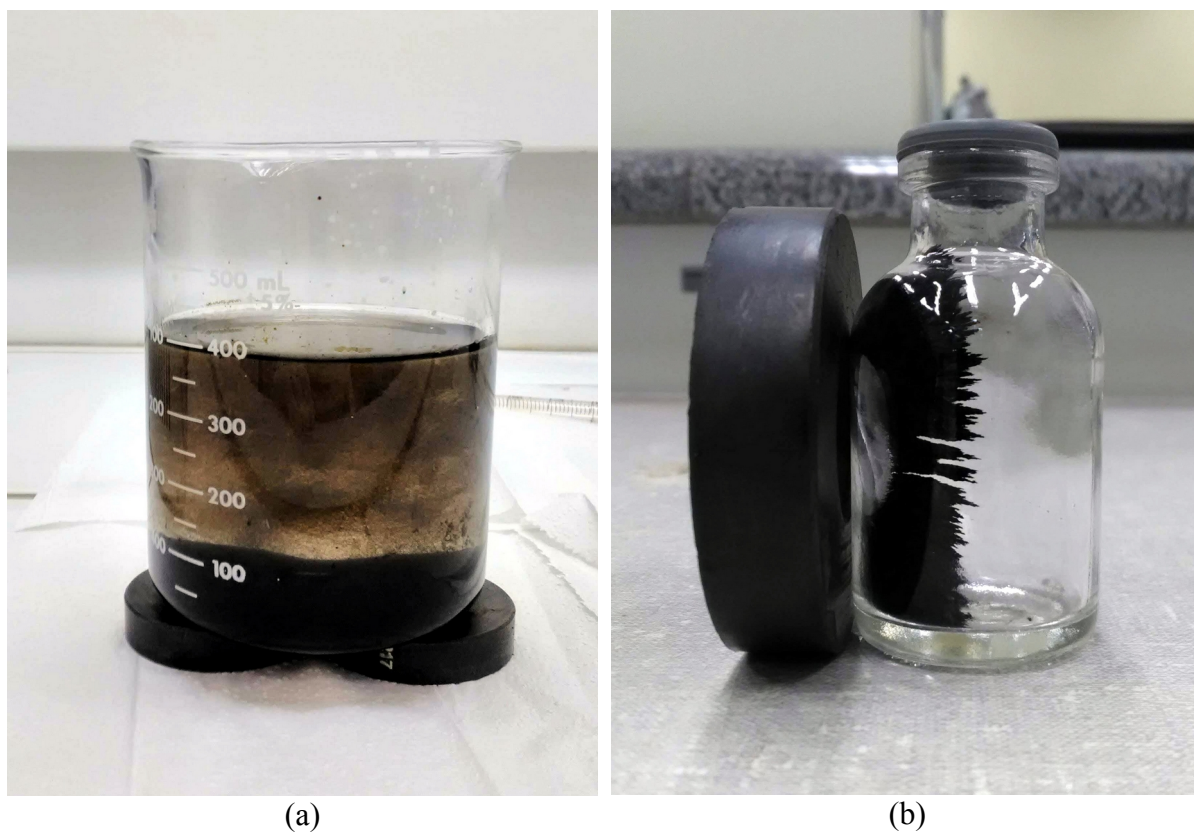


Figura 7: (a) Solução coloidal de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas com citrato, em processo de separação magnética; (b) material em pó obtido após a secagem de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

As Figuras 8 e 9 apresentam as micrografias das nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Na Figura 8 é observada a formação de aglomerados de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  da ordem de  $100\ \mu\text{m}$ . Tais aglomerados eram compostos por nanopartículas de estrutura aparentemente esférica, com diâmetros menores que  $20\ \text{nm}$  (Figuras 9 e detalhe da Figura 9). Estes resultados foram compatíveis com os obtidos na literatura (Tabela 2), a saber: Casals et al. (2014):  $7\ \text{nm}$  e  $20\ \text{nm}$  de diâmetro; Abdelsalam et al. (2017):  $7\ \text{nm}$ ; Aguilar-Moreno et al. (2020):  $20\ \text{nm}$ ; Cruz Viggi et al. (2014):  $100$  a  $150\ \text{nm}$ .

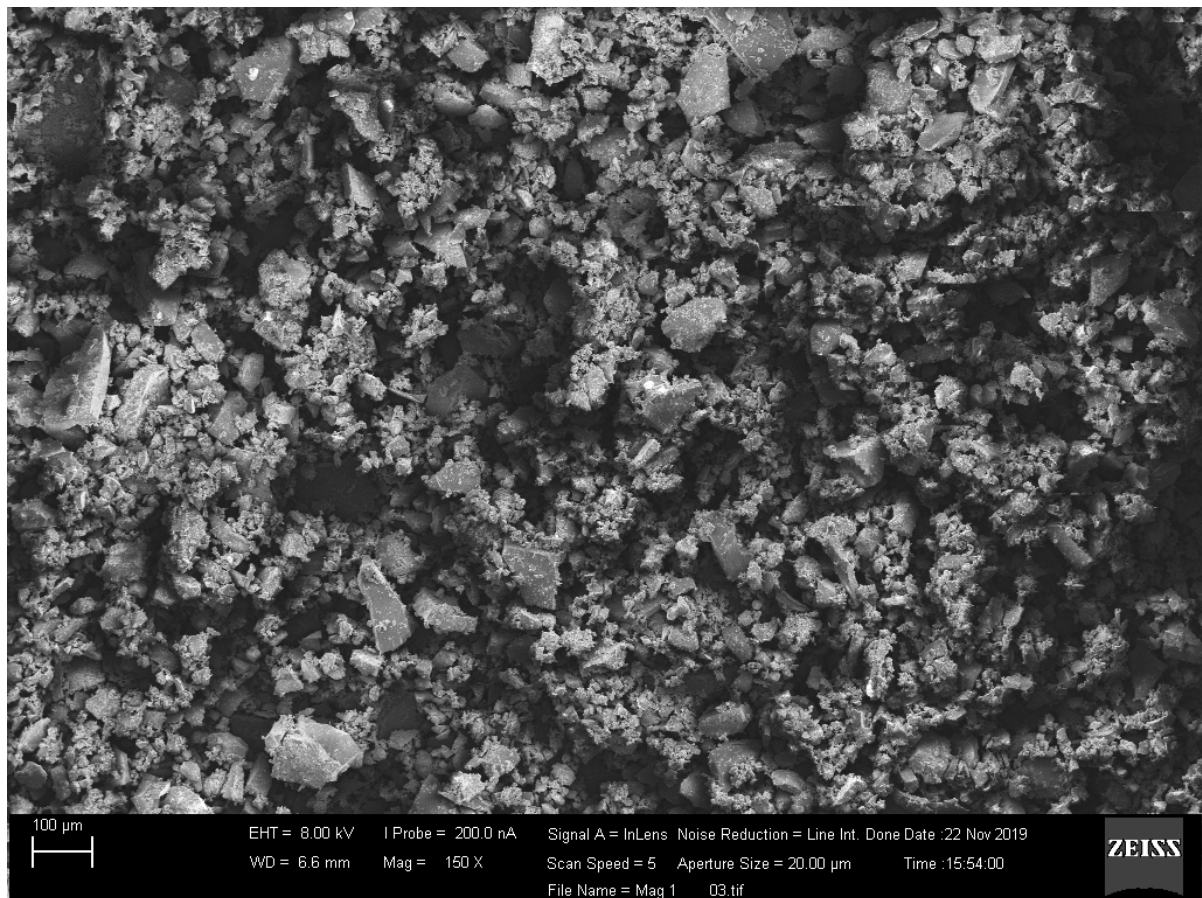


Figura 8: MEV dos aglomerados nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )



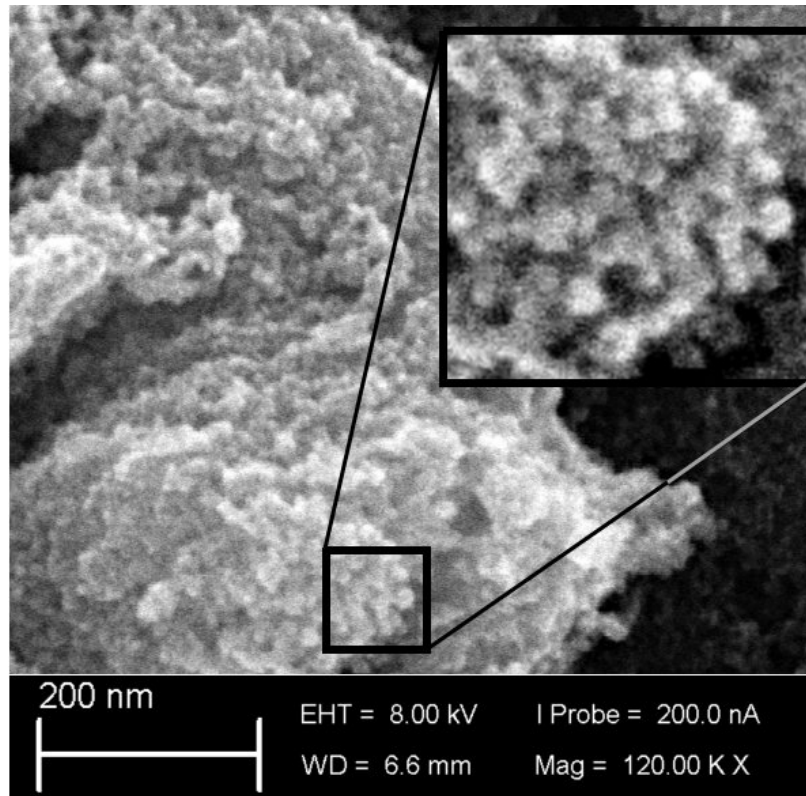


Figura 9: MEV das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : (a) estruturas esféricas formando aglomerados; (detalhe) partículas com diâmetro estimado inferior a 20 nm

Alguns autores sintetizaram nanopartículas utilizando compostos químicos como estabilizantes. Casals et al. (2014) obtiveram nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  revestidas com tetrametilamônio, em tamanhos diferentes, 7 nm e 20 nm de diâmetro médio, alterando dois parâmetros durante os processos de coprecipitação: concentração de sais de ferro e solução alcalina. Abdelsalam et al. (2017), por sua vez, obtiveram nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 7 nm utilizando cloreto de cetil trimetil amônio como agente antiaglomerante.

Outros autores utilizaram nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não revestidas em estudos de digestão anaeróbia. Também utilizando o método de coprecipitação, Cruz Viggi et al. (2014) relataram a síntese de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com 100-150 nm de diâmetro. Por outro lado, Aguilar-Moreno et al. (2020) sintetizaram nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 4,2 nm obtidas por coprecipitação.

Tais resultados indicaram que o citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ), utilizado para recobrir as nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  no presente trabalho, teve efeito estabilizante e antiagregante compatível com o descrito nos estudos realizados por Casals et al. (2014) e Abdelsalam et al. (2017).

As Figuras 10 e 11 apresentam as micrografias das nanopartículas de ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ). A Figura 10 mostra a formação de aglomerados de  $\text{Fe}^0$  da ordem de 100 a 500 nm. As figuras 11(a) e 11(b) mostram que as nanopartículas que compõem os aglomerados são esféricas e possuem diâmetros entre 50 e 100 nm. Tais resultados são compatíveis com os obtidos na literatura (Tabela 2), a saber: Abdelsalam et al. (2017): 9 nm de diâmetro médio; Amen et al. (2018): 50 a 100 nm; Wang et al. (2016): menor que 50 nm.

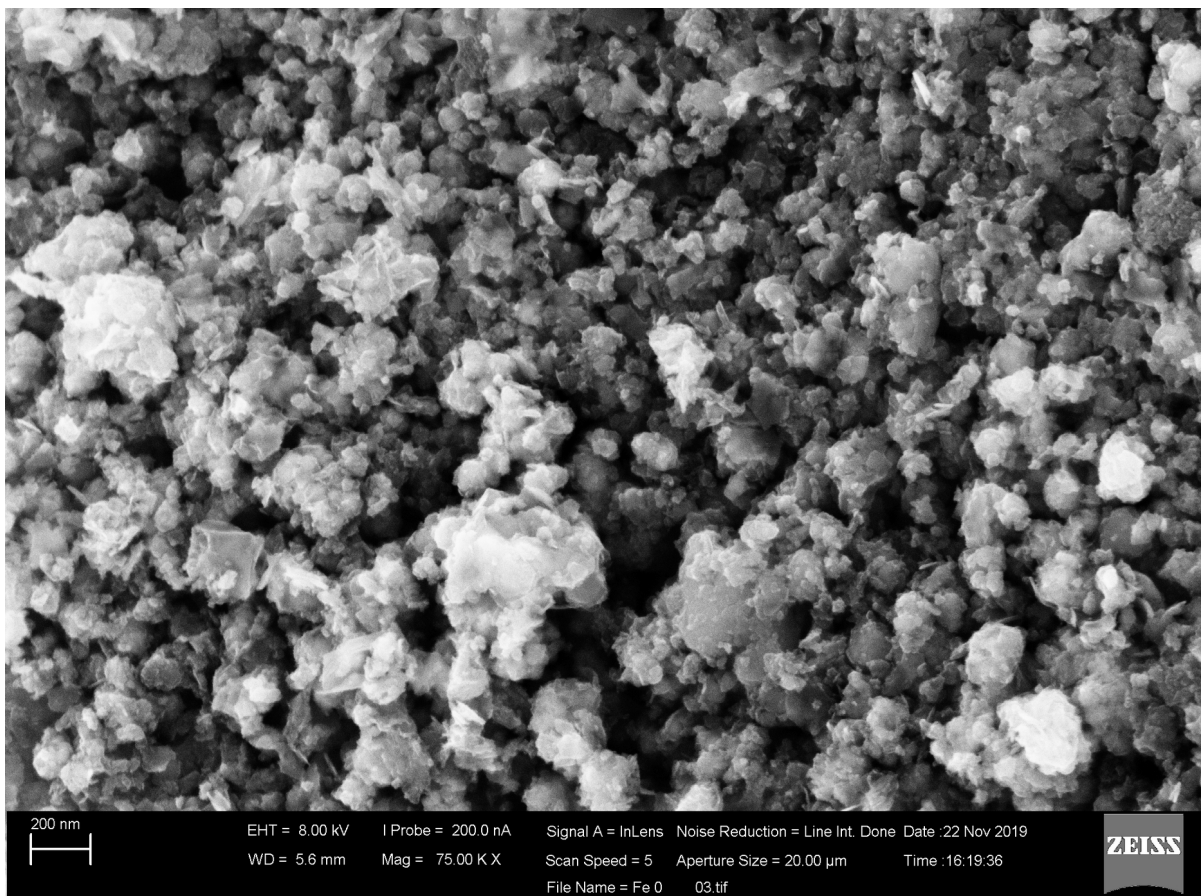


Figura 10: MEV dos aglomerados nanopartículas de ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ )

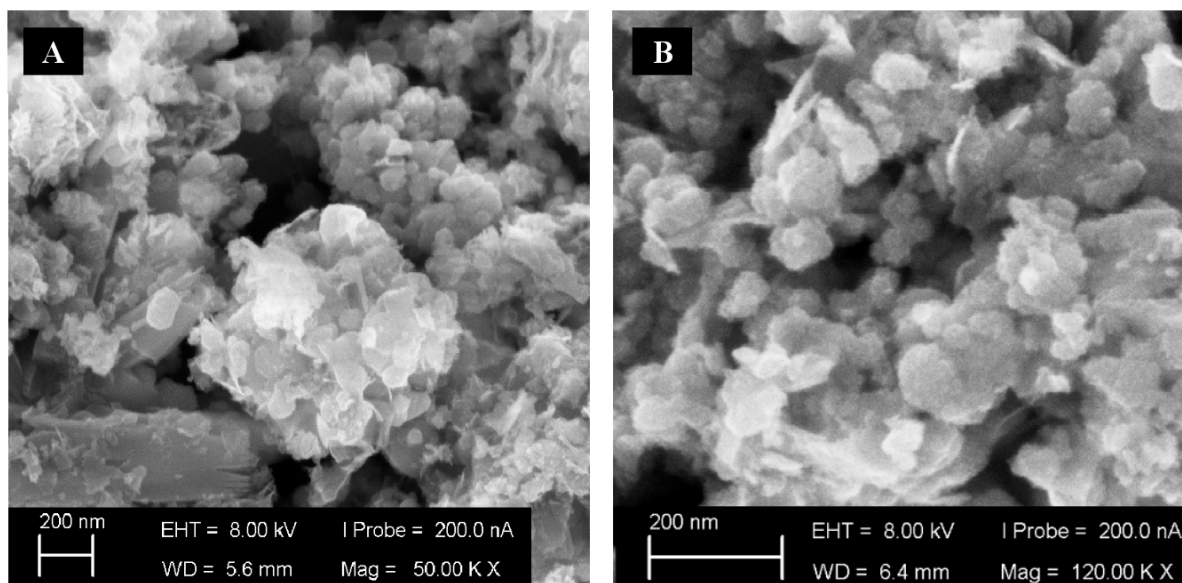


Figura 11: MEV das nanopartículas de  $\text{Fe}^0$ : (a) e (b) aglomerados formados por partículas esféricas com diâmetro 50 e 100 nm

Wang et al. (2016) adquiriram da empresa Sigma Aldrich nanopartículas em pó, sem estabilizantes, com diâmetro menor que 50 nm garantido pelo fabricante.

Abdelsalam et al. (2017), por sua vez, obtiveram nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  com diâmetro médio de 9 nm utilizando cloreto de cetil trimetil amônio como agente antiaglomerante.

Sun et al. (2006), estudo no qual se baseia o método de produção de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  por meio da redução por  $\text{NaBH}_4$  utilizado neste estudo, sintetizaram nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  sem o uso de estabilizantes. Os autores, utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), determinaram que mais de 92% das partículas sintetizadas pelo método apresentavam diâmetro inferior a 100 nm, com diâmetro médio de 70 nm, e o restante das partículas com tamanho entre 200 e 250 nm.

Amen et al. (2018), também sintetizaram nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  com diâmetro médio 50 a 100 nm sem adição de qualquer agente estabilizante.

Nota-se que os autores Sun et al. (2006) e Amen et al. (2018), os quais sintetizaram nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  sem adição de estabilizantes, obtiveram tamanhos mais próximos aos obtidos no presente trabalho. Tal correlação pode indicar que o citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ), utilizado como estabilizante no presente trabalho, pode não exercer efeito antiaglomerante significativo em nanopartículas de  $\text{Fe}^0$ .

A Figura 12 apresenta as micrografias eletrônicas das nanopartículas de ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ). A Figura 12(a) mostra a formação de aglomerados de nanopartículas da ordem de 200 nm a 1  $\mu\text{m}$ . A Figura 12(b) aponta a formação de nanopartículas de aspecto assimétrico, com tamanho aproximado de 100 nm. Tais resultados foram compatíveis com: Abdallah et al. (2019): 200 a 1000 nm de diâmetro; Chen et al. (2018): 50 nm; Zhou et al. (2022): aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  (Tabela 2). Nenhum destes autores utilizou aditivos estabilizantes durante a síntese ou ressuspensão das nanopartículas  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ .

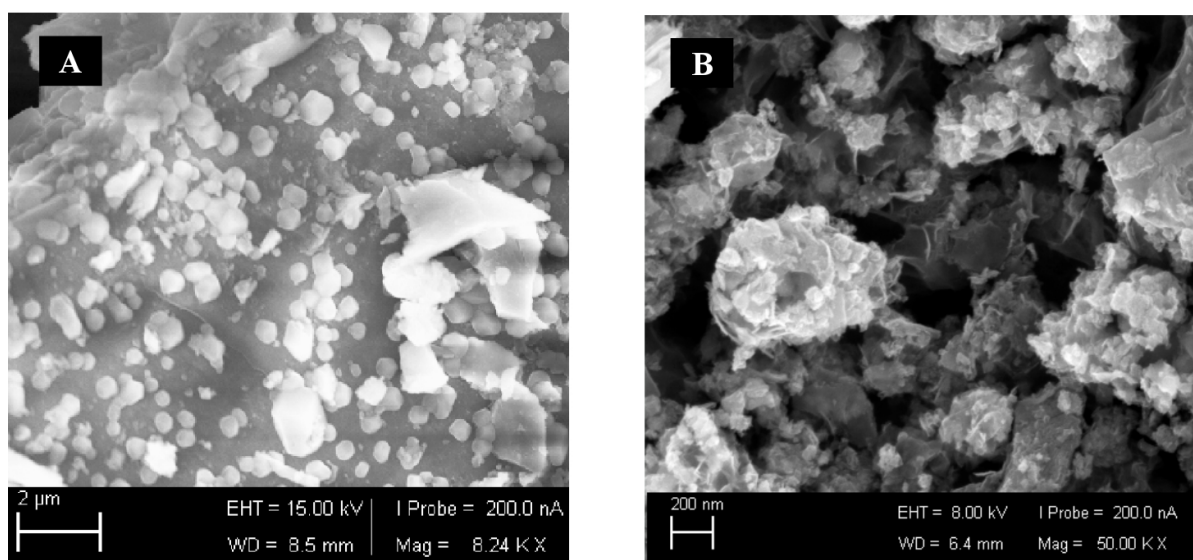


Figura 12: MEV das nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ : (a) aglomerados da ordem de 1  $\mu\text{m}$ ; (b) partículas assimétrico com tamanho aproximado de 100 nm formando aglomerados

A Figura 13 apresenta o mapa produzido por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) para a distribuição de elementos químicos (Fe, Cl, Ni, O, Na, Al) na superfície de uma partícula de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ . A Figura 14 apresenta o espectro de EDS e a porcentagem em massa para cada elemento presente na superfície da mesma partícula.

Pode-se observar nas Figuras 13 e 14 que os átomos de Fe, Ni e O estão distribuídos de forma homogênea na superfície da partícula. Nota-se também que a proporção entre as massas de Ni e Fe é de aproximadamente 1:2. Estes dados comprovaram a formação do composto de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ . (No mapa e espectro de EDS as bandas de alumínio (Al) são produzidas pelo suporte onde foram acondicionadas as partículas para análise; as bandas de cloro (Cl) indicam a presença de resíduos dos sais de Fe e Ni ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) utilizados na

síntese; as bandas de sódio (Na) indicam a presença de resíduos de NaOH utilizado na síntese).

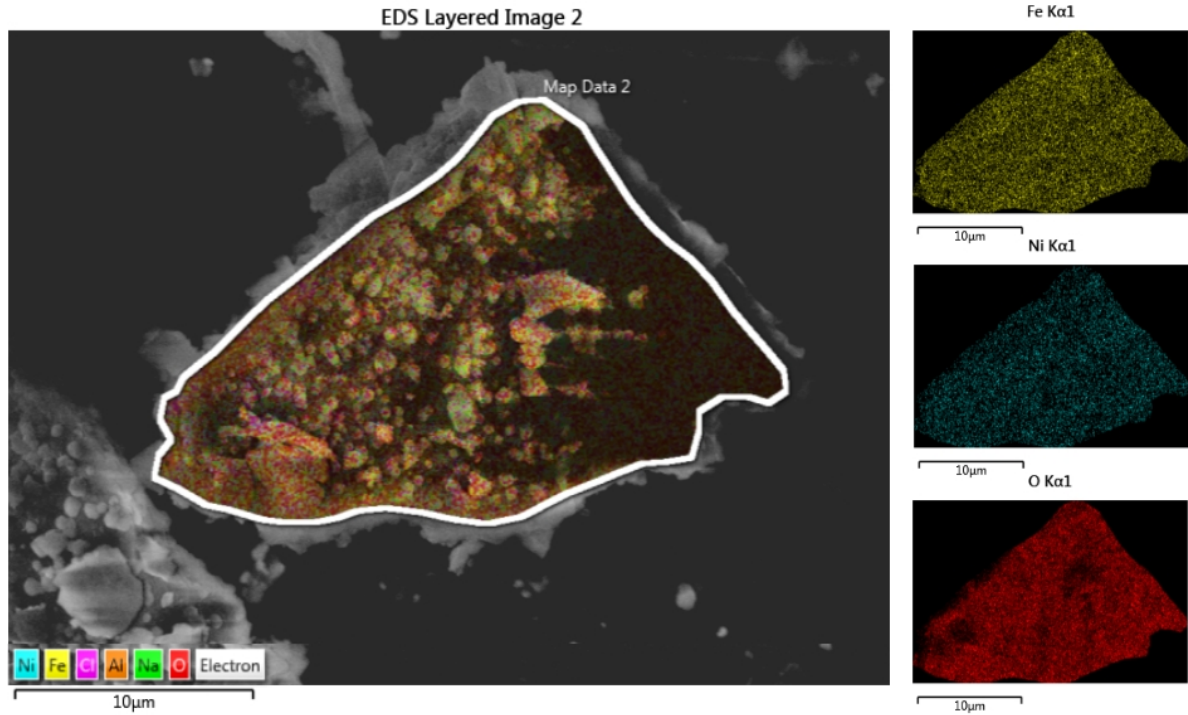


Figura 13: Mapa composicional de partícula de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  produzido por EDS. Detalhes: distribuição dos átomos de Fe, Ni e O na superfície da partícula

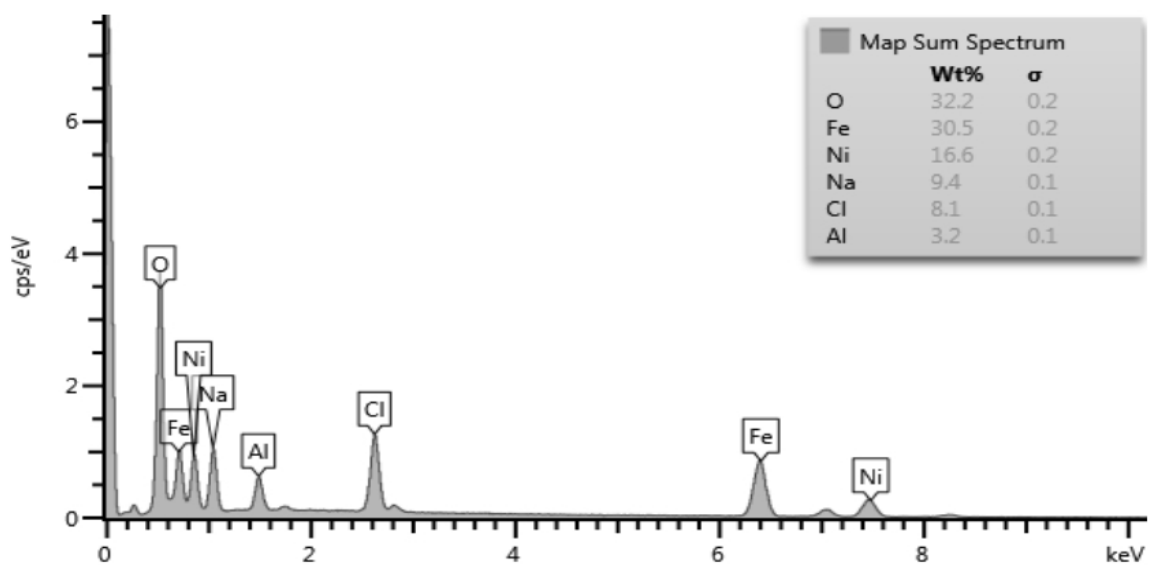


Figura 14: espectro de EDS e a porcentagem em massa para cada elemento

As Figuras 15, 16 e 17 apresentam as distribuições de tamanho de partículas obtidas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Nota-se que estes resultados se referem ao comportamento das nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) em um meio aquoso.

A Figura 15 mostra que, em solução aquosa, as nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) formaram aglomerados de diferentes diâmetros (polidispersos), com picos em, aproximadamente, 190 nm, 1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ . Tais resultados são compatíveis com os obtidos por meio da micrografia apresentada na Figuras 8 e 9, conforme descrito anteriormente.

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 854,1	<b>Peak 1:</b> 1047	51,9	255,0
<b>Pdl:</b> 1,000	<b>Peak 2:</b> 187,8	31,4	45,54
<b>Intercept:</b> 0,880	<b>Peak 3:</b> 5379	14,3	323,5
<b>Result quality</b>	<b>Refer to quality report</b>		

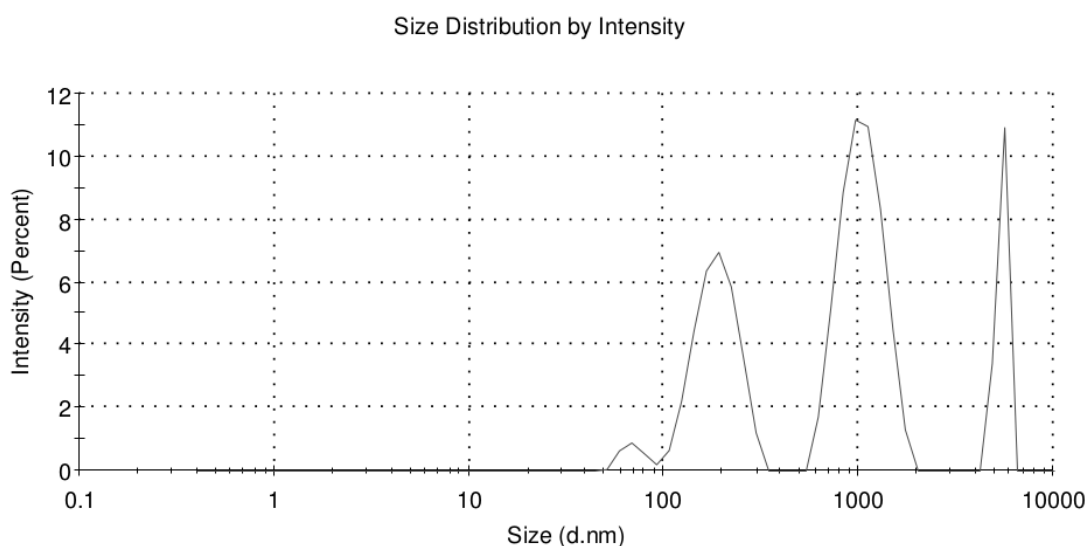


Figura 15: Distribuições de tamanho de partículas obtidas por DLS para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Tais resultados também foram compatíveis com os descritos na literatura. Andreas et al. (2012), estudo no qual se baseia o método de recobrimento e estabilização de nanopartículas com citrato utilizado no presente estudo, sintetizaram nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com diâmetro entre 6 e 7 nm, determinado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Os mes-

mos autores avaliaram, por meio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), o raio hidrodinâmico médio das nanopartículas recobertas com citrato em 98,13 nm.

Aguilar-Moreno et al. (2020), além de analisarem o diâmetro das nanopartículas por TEM, determinado em 4,2 nm de diâmetro médio, também avaliaram por DLS o tamanho das partículas sintetizadas, determinando o raio hidrodinâmico médio em 79,37 nm.

Por outro lado, Wang et al. (2016) adquiriram nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita, substância química e estruturalmente semelhante à magnetita) com diâmetro médio inferior a 50 nm (garantido pelo fabricante, Sigma-Aldrich). Para utilização destas nanopartículas em reatores anaeróbios, os autores ressuspenderam as partículas em água destilada utilizando do-decilbenzeno sulfonato de sódio 0,1 mM como dispersante. Após ressuspensão, os autores determinaram o raio hidrodinâmico médio em 108 nm, por meio da técnica de DLS.

Os resultados obtidos neste estudo, bem como os relatados na literatura, demonstram que há formação de agregados ou aglomerados de partículas quando as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  encontram-se em solução. No presente estudo, o citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ) foi utilizado com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas e evitar a formação de agregados de partículas, proporcionando uma dispersão coloidal estável.

A Figura 16 mostra que, em solução aquosa, as nanopartículas de ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) formaram aglomerados de diâmetros constante (monodisperso) de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Os resultados observados nas Figuras 10 e 11, obtidos por MEV, indicaram a formação de aglomerados ligeiramente menores.

		Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...	
<b>Z-Average (d.nm):</b>	3787	<b>Peak 1:</b>	878,1	100,0	64,08
<b>Pdl:</b>	0,793	<b>Peak 2:</b>	0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b>	1,09	<b>Peak 3:</b>	0,000	0,0	0,000
<b>Result quality</b>	<b>Refer to quality report</b>				

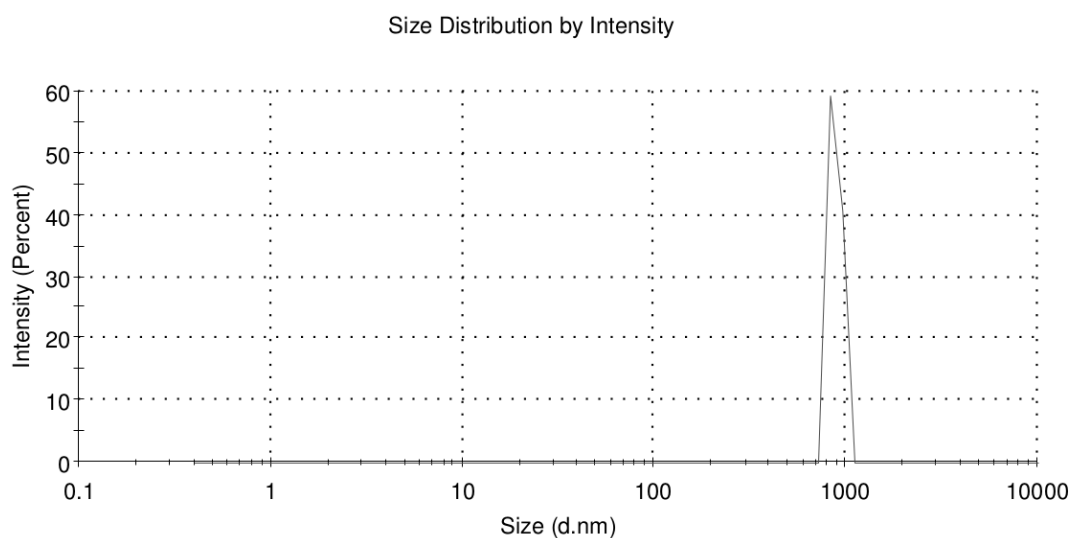


Figura 16: Distribuições de tamanho de partículas obtidas por DLS para as nanopartículas de  $\text{Fe}^0$

Assim como no experimento com nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , Wang et al. (2016) ressuspenderam as nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  (<50 nm, Sigma Aldrich) em água destilada utilizando do decilbenzeno sulfonato de sódio 0,1 mM como dispersante. Após ressuspensão, os autores determinaram por DLS o raio hidrodinâmico médio das nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  em 128 nm.

Sun et al. (2006), no qual se baseia o método de síntese deste trabalho, utilizou o método da Espectrometria Acústica como complemento à avaliação dos tamanhos de partículas realizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão. O método da Espectroscopia Acústica, assim como o DLS, avalia o tamanho das partículas em dispersão num meio aquoso. Os autores avaliaram, por meio da Espectroscopia Acústica, que as nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  sintetizadas (sem aditivos estabilizantes) possuíam diâmetro médio de 105 nm, maior que o valor médio de 70 nm obtido por TEM. Os autores concluíram também, pelas imagens de TEM, que a maioria das nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  formaram agregados em forma de novelo, gerando



partículas de 800 nm a 1 µm de diâmetro, resultado compatível com os obtidos no presente estudo por meio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

Com base nos resultados obtidos por MEV e DLS, e nos valores relatados por Wang et al. (2016) e Sun et al. (2006), foi possível inferir novamente que o citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ), utilizado como estabilizante no presente trabalho, pode não exercer efeito antiaglomerante significativo em nanopartículas de  $\text{Fe}^0$ .

A Figura 17 mostra que, em solução aquosa, as nanopartículas de ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) formaram aglomerados com larga distribuição de tamanhos de partícula, variando de 100 a 1100 nm. Tais resultados são compatíveis aos obtidos por meio da micrografia apresentada na Figura 12.

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 522,4	<b>Peak 1:</b> 348,8	65,4	132,2
<b>Pdl:</b> 0,500	<b>Peak 2:</b> 931,1	33,4	267,8
<b>Intercept:</b> 0,906	<b>Peak 3:</b> 5560	1,1	6,104e-5

**Result quality** Refer to quality report

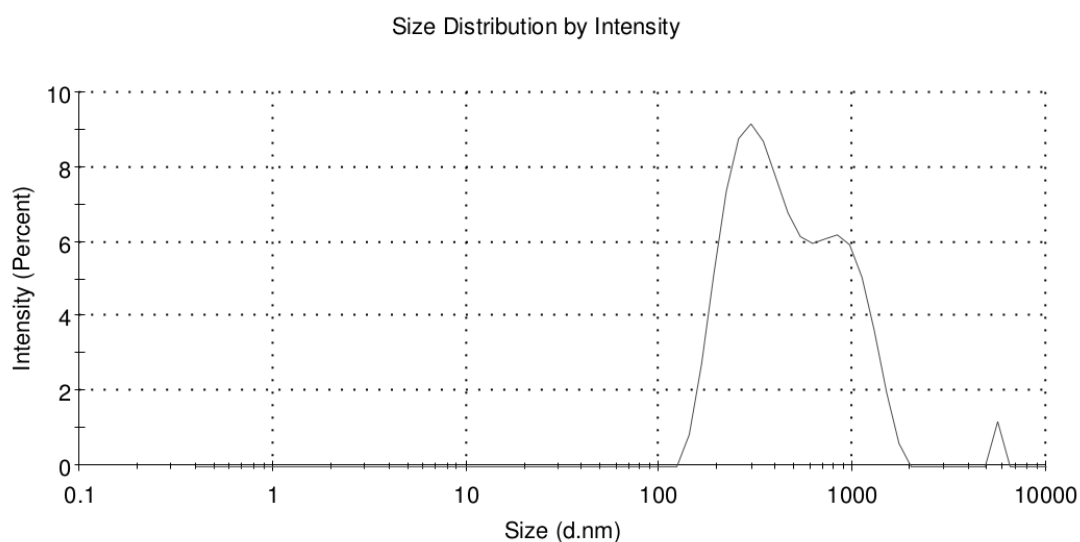


Figura 17: Distribuições de tamanho de partículas obtidas por DLS para as nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$

Dos autores que sintetizaram nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  alistados na Tabela 2, apenas Chen et al. (2018) dimensionaram as partículas suspensas em meio aquosos. Os autores, que

adquiriram  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  com diâmetro médio inferior a 50 nm (garantido pelo fabricante, Sigma-Aldrich) ressuspenderam as partículas apenas em água destilada, sem adição de dispersantes ou antiagregantes. Após análise por DLS, os autores determinaram em 46 nm o diâmetro médio das nanopartículas (o estudo não faz referência ao raio hidrodinâmico das partículas ou à formação de agregados de partículas).

Desta forma, os resultados obtidos pelas microscopias eletrônicas (MEV) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) demonstram que as metodologias de síntese utilizadas neste estudo produziram partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) com estruturas nanométricas.

Entretanto, apesar do recobrimento das partículas com citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ), houve agregação de nanopartículas, especialmente de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$ , tanto no material seco quanto nas suspensões (meio aquoso).

Por fim, a equivalência entre os resultados de microscopias eletrônicas (MEV) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram que estas técnicas podem ser utilizadas de forma complementar para a determinação dos tamanhos das partículas utilizadas nos ensaios de produção de biogás. Enquanto a microscopia eletrônica de varredura forneceu informações mais detalhadas sobre estrutura e tamanho das nanopartículas, a técnica de espalhamento dinâmico de luz fornece resultados mais rápidos e baratos sobre o diâmetro dos aglomerados de nanopartículas.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO LODO GRANULAR ANAERÓBIO

Os teores de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Totais Fixos (STF) e Ferro Total do lodo granular anaeróbio estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Teores de sólidos e ferro no lodo granular anaeróbio

Sólidos Totais (ST)	$53,1 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$
Sólidos Totais Voláteis (STV)	$45,3 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$
Sólidos Totais Fixos (STF)	$7,9 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$
Ferro Total	$17,5 \pm 0,5 \text{ mg g}_{\text{ST}}^{-1}$

Observou-se que o teor de sólidos voláteis deste lodo granular anaeróbio representa aproximadamente 85% do conteúdo de sólidos totais. O percentual elevado de sólidos voláteis indica uma quantidade elevada de material orgânico no lodo, o que sugere abundância de microrganismos e outros compostos orgânicos provenientes do abate avícola.

O teor de ferro total indica que os microrganismos presentes no lodo granular estão adaptados a concentrações relativamente elevadas deste micronutriente. Chernicharo (2007) estabeleceu em  $1,8 \text{ mg g}_{\text{ST}}^{-1}$  a necessidade de ferro para microrganismos metanogênicos, cerca de dez vezes menos que o encontrado no lodo granular estudado. Estes teores elevados de ferro neste lodo granular anaeróbio são provenientes, provavelmente, da decomposição dos resíduos do abate avícola contendo sangue, gerados e dispostos na água residuária que formou o afluente do reator UASB.

Tal lodo granular tem sido testado em digestão anaeróbia de diferentes resíduos orgânicos com sucesso nos consumos de glicerol bruto. Rodrigues et al. 2020 testou este lodo granular na co-digestão de glicerol bruto ( $240 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) e esgoto sanitário e obteve gerações de hidrogênio ( $35,82 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 1,3 Propanodiol e ácido acético. Adames et al. (2022) testaram os consumos de glicerol bruto em 3 reatores anaeróbios de leito fixo montados em série (R1, R2 e R3) com lodo granular avícola e alimentados com glicerol bruto co-digerido em esgoto sanitário. Os autores obtiveram remoções de 99,9% do glicerol bruto, além de verificarem gerações de hidrogênio em R1 ( $10,3 \text{ mol-H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ ) e metano em R2 e R3 ( $312,0$  e  $283,9 \text{ L}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ , respectivamente).

## 5.3 TESTES PRELIMINARES

**Teste 1 – Controle de pH.** A Figura 18 mostra a alteração do pH em função tempo para cada tipo e concentração de solução tampão adicionada ao meio líquido dos reatores. A Tabela 10 sintetiza os valores mínimos de pH, acompanhados do instante em que foram verificados, bem como o pH final para as diferentes soluções tamponantes.

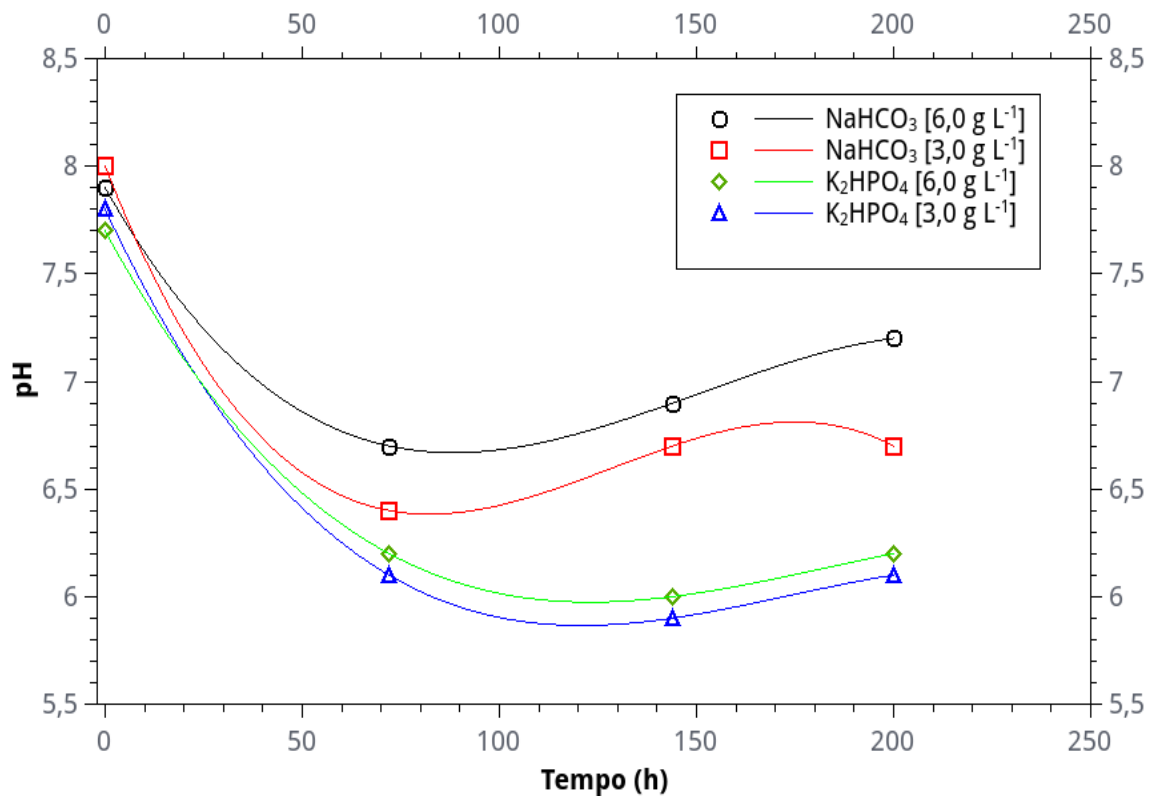


Figura 18: Evolução do pH em função do tempo para diferentes tipos e concentrações de soluções tampão

Tabela 10: Valores mínimos e finais de pH para diferentes soluções tamponantes

Tamponante	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	pH mínimo (instante de verificação)	pH final (200 h)
NaHCO <sub>3</sub>	6,0	6.7 (70 h)	7.2
NaHCO <sub>3</sub>	3,0	6.4 (70 h)	6.7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0	6.0 (140 h)	6.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0	5.9 (140 h)	6.1

Foi verificado que, para ambas as concentrações (3,0 e 6,0 g L<sup>-1</sup>), o tampão de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) não foi capaz de controlar a acidificação dos reatores, que ocorreu até 140 horas após o início da operação. Após 200 horas de operação, os reatores tamponados com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> atingiram pH final entre 6.1 e 6.2, desfavorável para a atividade metanogênica (Van et al., 2020).

O tampão de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) na concentração de 3,0 g L<sup>-1</sup> foi capaz de elevar o pH após a fase acidogênica (após 70 horas de operação) sem atingir, entretanto, pH entre 7,0 e 7,2, ideal para a fase metanogênica (Van et al., 2020).

Assim, com base nos testes realizados, foi determinado o uso da solução tampão de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) na concentração de 6,0 g L<sup>-1</sup> para os ensaios com volume reacional de 250 mL e demanda química de oxigênio igual ou superior a 15 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>, por apresentar efeito tamponante superior às demais soluções testadas. Ou seja, foi controlada a acidificação (pH mínimo de 6.7 após 70 horas de operação) e atingido pH 7.2 após 200 horas de operação do reator.

**Teste 2 – Quantidade de inóculo.** A Figura 19 mostra o gráfico da produção acumulada de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL g}_{\text{STV}}^{-1}$ ) para os ensaios com diferentes quantidades de inóculo. A Tabela 11 apresenta os valores obtidos por meio do ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático de Gompertz (modificado), descrito pela Equação 11.

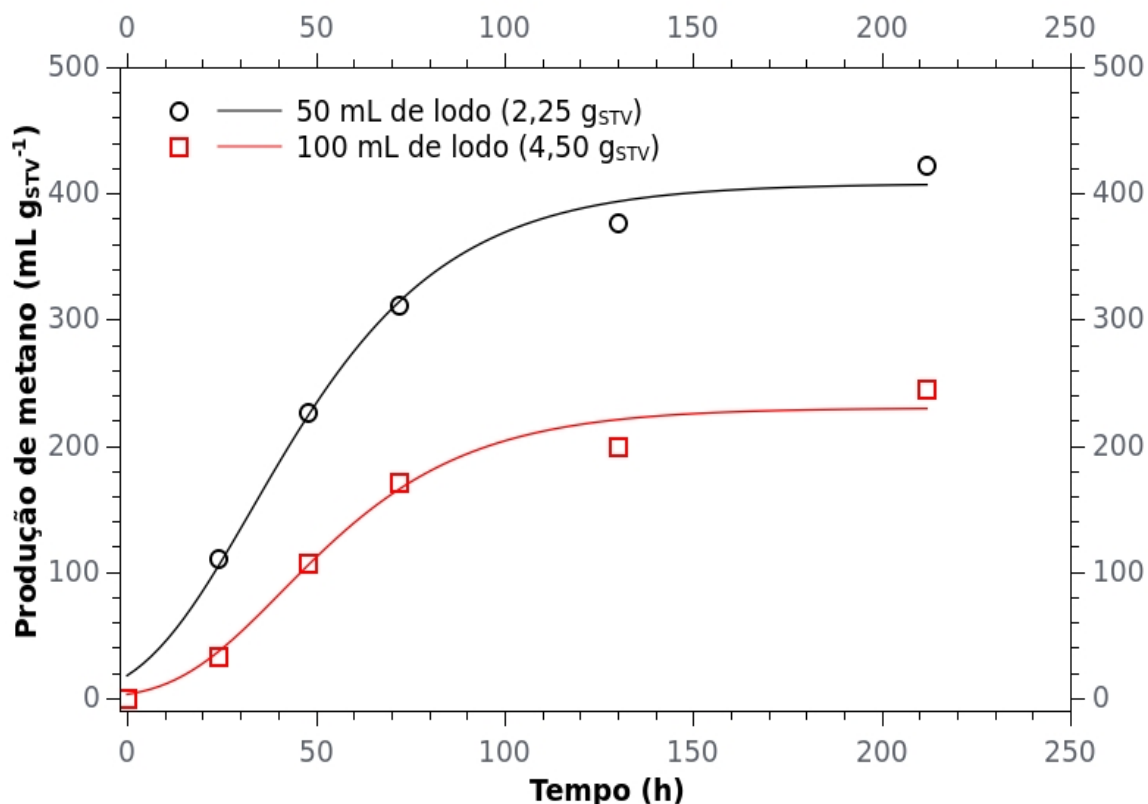


Figura 19: Produção acumulada de metano para diferentes quantidades de inóculo

Tabela 11: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes quantidades de inóculo

Quantidade de Inóculo	Potencial de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL g}_{\text{STV}}^{-1}$ )	Taxa máxima de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL (g}_{\text{STV}} \text{ h}^{-1})$ )	Instante de máxima produção de $\text{CH}_4$ (h)
50 mL (2,25 $\text{g}_{\text{STV}}$ )	407,7	5,1	35
100 mL (4,50 $\text{g}_{\text{STV}}$ )	229,9	3,0	40

Foi verificado que a geração de metano ocorreu para ambas quantidades de inóculo testado. Entretanto, na concentração de 2,25  $\text{g}_{\text{STV}}$  (50 mL de lodo granular) a produção de me-

tano por massa de sólidos totais voláteis foi 77% maior, se comparado com os testes contendo 4,50 g<sub>STV</sub> (100 mL de lodo granular). Nos testes com 50 mL de inóculo, a taxa máxima de geração de metano foi 70% superior à taxa observada nos testes com 100 mL de inóculo. Além disso, o pico de produção de metano ocorreu mais rapidamente nos testes com 50 mL de inóculo, isto é, cerca de 5 horas antes dos reatores com 100 mL de lodo granular (Figura 19, Tabela 11).

Assim, foi determinado o uso de 50 mL de lodo (2,25 g<sub>STV</sub>) para os ensaios com volume reacional de 250 mL e demanda química de oxigênio igual ou superior a 15 g<sub>DQO</sub> L<sup>-1</sup>.

## 5.4 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS COM ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

### 5.4.1 MAGNETITA

A Figura 20 apresenta o gráfico com a produção acumulada de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL g}_{\text{STV}}^{-1}$ ) para os ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), após transcorridas 340 horas (14 dias) desde o início dos ensaios. Em complemento, a Figura 21 apresenta a evolução das taxas de produção de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL (g}_{\text{STV}} \text{h})^{-1}$ ) obtida por meio da Equação 14.

São condições iniciais para estes experimentos:  $\text{pH} = 7,8$  e  $25 \text{ g}_{\text{DQO}} \text{ L}^{-1}$ .

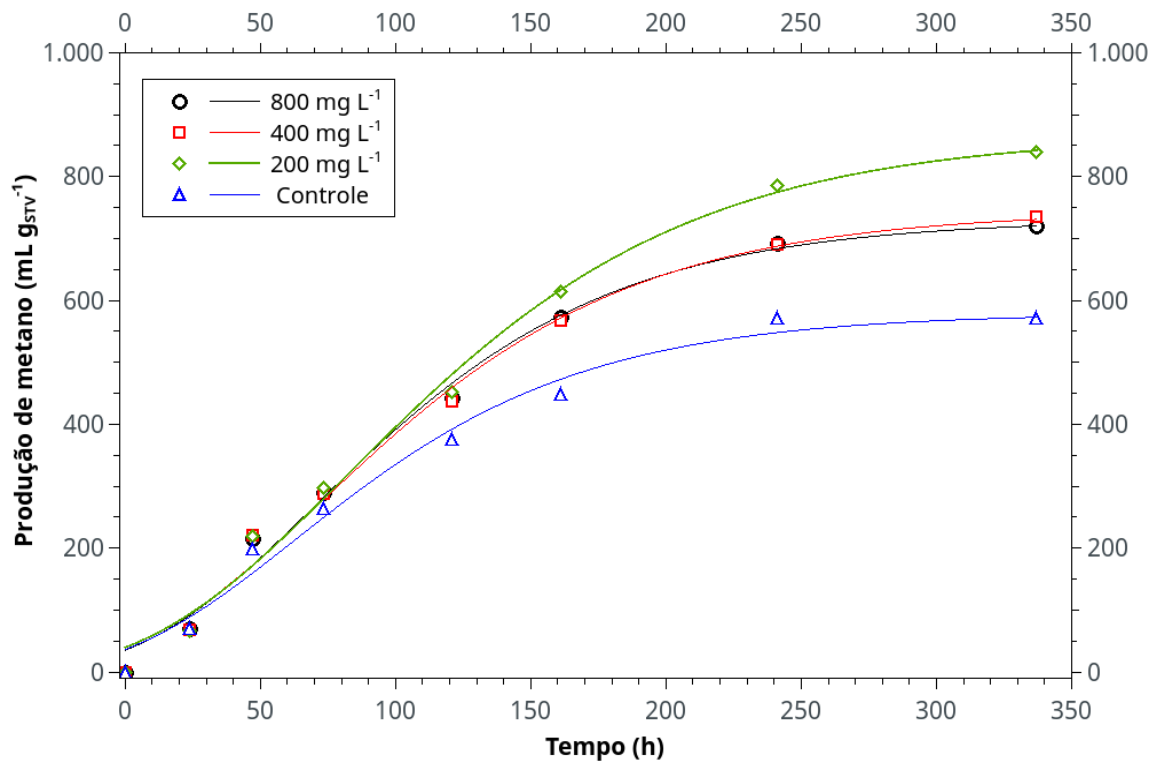


Figura 20: Volumes acumulados de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$



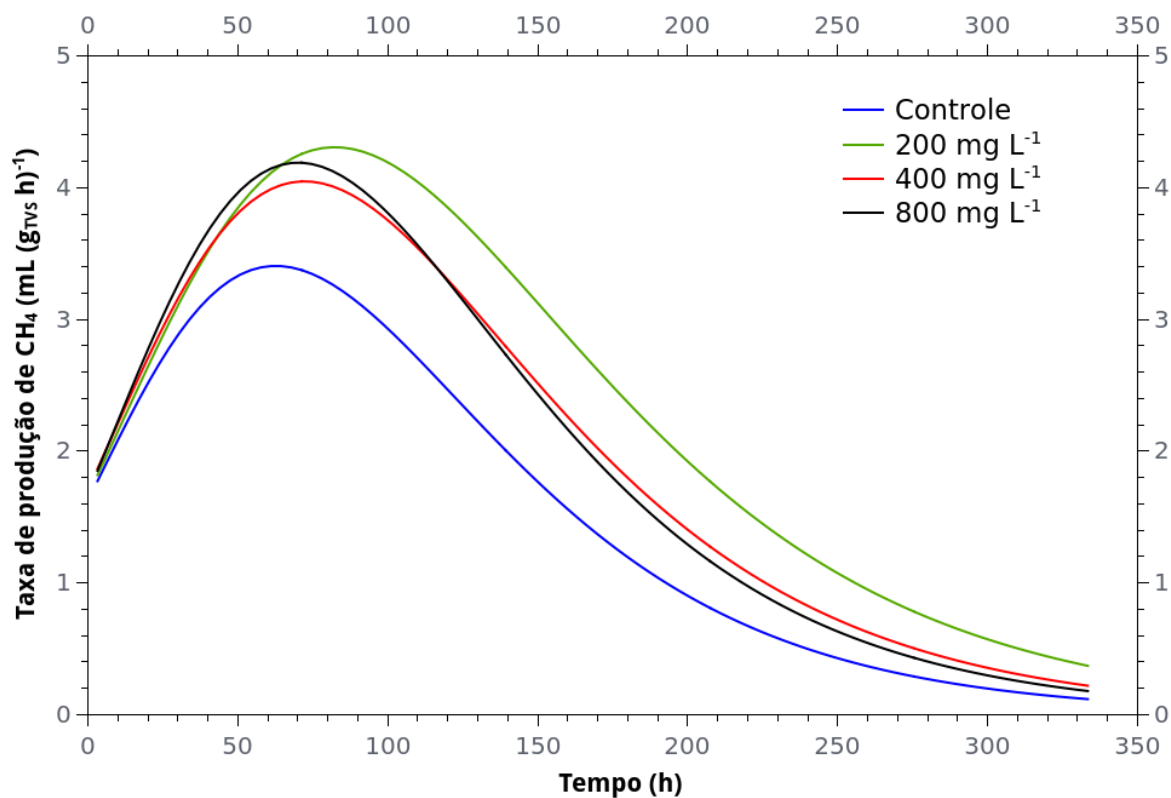


Figura 21: Taxas de produção de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

A Tabela 12 apresenta os valores obtidos por meio do ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático de Gompertz (modificado), descrito pela Equação 11.

Tabela 12: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Ensaio	Concentração de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Potencial de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL gSTV}^{-1}$ )	Taxa máxima de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL (gSTV h)}^{-1}$ )	Instante de máxima produção de $\text{CH}_4$ (h)
Controle	0	579,6	3,5	61
1	200	868,8	4,4	91
2	400	744,8	4,1	78
3	800	731,2	4,2	77

A produção de metano nos ensaios realizados apresentou comportamentos distintos, como é possível observar pelas Figuras 20 e 21 e pela Tabela 12.

Em todos os ensaios com adição de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram verificadas produções de metano superiores ao reator Controle. Os ensaios com 200, 400 e 800  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  geraram, respectivamente, 49,8%, 28,5% e 26,0% mais metano quando comparados ao reator Controle. Observa-se que os acréscimos de produção de metano verificados neste trabalho são equivalentes aos relatados em alguns dos estudos mencionados na Tabela 2, tais como Casals et al. (2014), Abdelsalam et al. (2017), Aguilar-Moreno et al. (2020), Im et al. (2019) e Cruz Viggì et al. (2014), os quais relataram, respectivamente, aumentos de 234, 59, 79, 16 e 33% na produção de metano em reatores suplementados com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Nota-se, entretanto, que os referidos autores testaram a biodigestão de substratos naturais agrícolas, como esterco fresco (Abdelsalam et al., 2017) e cama de frango (Aguilar-Moreno et al., 2020), ou substratos ultrapuros como celulose microcristalina (Casals et al., 2014), glicerol (Im et al., 2019) e propionato (Cruz Viggì et al., 2014). Tais estudos não relacionaram resíduos industriais reais e suas impurezas com o uso de nano-aditivos em digestão anaeróbia. Portanto, é notável o aumento de até 49% na produção acumulada de metano em reatores suplementados com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e alimentados com glicerol bruto não purificado.

Nas condições impostas nos ensaios, o efeito das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi perceptível após, aproximadamente, 50 horas de operação, ou seja, após a fermentação. Pode-se afirmar, provavelmente, que o efeito benéfico da adição de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ocorreu na metanogênese, sendo assim indiferente durante a hidrólise e fermentação do glicercerol bruto. Tal evidência foi verificada pela sua manutenção durante o período restante do experimento, por exemplo, durante a fase de maior de produção (entre 50 e 150 horas) a taxa de geração de  $\text{CH}_4$  foi sempre superior à do Controle. De fato, a taxa máxima de geração de metano ( $4,4 \text{ mL (g}_{\text{STV}} \text{ h)}^{-1}$ ) ocorreu com a adição de 200  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e foi 26% superior à taxa máxima do reator controle (Figura 21 e Tabela 12).

Além disso, a adição de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , além de estar associada a maiores taxas de produção de metano, também prolonga o período de produção de metano. O ensaio suplementado com 200  $\text{mg L}^{-1}$  de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  atingiu a taxa máxima de produção de biogás em 91 horas de operação, ou seja, cerca de 30 horas mais tarde se comparado ao reator de controle (Tabela 12, Figura 21).

A Figura 22 mostra a eficiência percentual de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

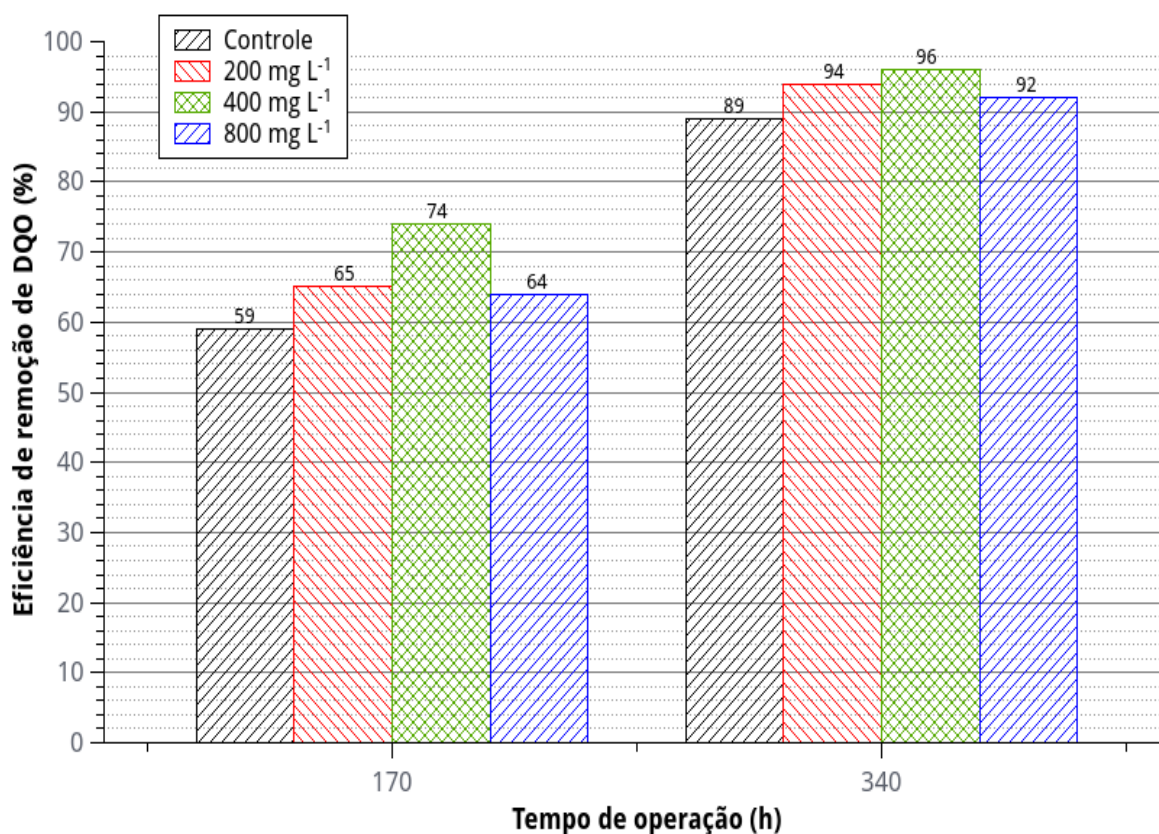


Figura 22: Eficiência de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

A remoção de DQO foi mais elevada nas primeiras 170 horas (7 dias) do ensaio. Entretanto, transcorridas 340 horas (14 dias) de operação, a remoção de DQO foi superior a 90% para todas as concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Destaca-se ainda que o reator contendo 400  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentou remoções mais elevadas de DQO, se comparado com o Controle, nas primeiras 170 horas de ensaio. A remoção de DQO foi acompanhada pelo aumento da taxa de produção de biogás (Figura 21).

O rendimento de produção de  $\text{CH}_4$  também pode ser expresso em termos de volume de  $\text{CH}_4$  por grama de DQO removido. No presente estudo, o reator controle e os ensaios com 200, 400 e 800  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  geraram, respectivamente, 242, 335, 282 e 289  $\text{mL g}_{\text{DQO}}^{-1}$ . Tais valores foram compatíveis com os resultados encontrados nos estudos com ênfase em digestão anaeróbia de glicerol bruto (sem adição de nanopartículas), alistados na Tabela 7, a saber: 292  $\text{mL g}_{\text{DQO}}^{-1}$  (Siles López et al., 2009); 356  $\text{mL g}_{\text{DQO}}^{-1}$  (Siles López et al., 2010); 358  $\text{mL g}_{\text{DQO}}^{-1}$  (Baba et al., 2013). É importante salientar, entretanto, que os autores Si-

les López et al. realizaram a biodigestão anaeróbia do glicerol bruto pré-tratado, isto é, acidificado (2009) e purificado (2010), enquanto os autores Baba et al. (2013) relataram rendimento máximo após estabilização de um reator contínuo. Portanto, é notável a geração de até 335 mL de  $\text{CH}_4 \text{ g}_{\text{DQO}}^{-1}$  em reatores em batelada suplementados com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e alimentados com glicerol bruto não purificado.

#### 5.4.2 FERRO ZERO-VALENTE

A Figura 23 apresenta o gráfico com produção acumulada de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL g}_{\text{STV}}^{-1}$ ) para os ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}^0$ ), após transcorridas 340 horas (14 dias) desde o início dos ensaios. Em complemento, a Figura 24 apresenta a evolução das taxas de produção de  $\text{CH}_4$  ( $\text{mL (g}_{\text{STV}} \text{ h)}^{-1}$ ) obtida por meio da Equação 14.

São condições iniciais para estes experimentos:  $\text{pH} = 7,8$  e  $30 \text{ g}_{\text{DQO}} \text{ L}^{-1}$ .

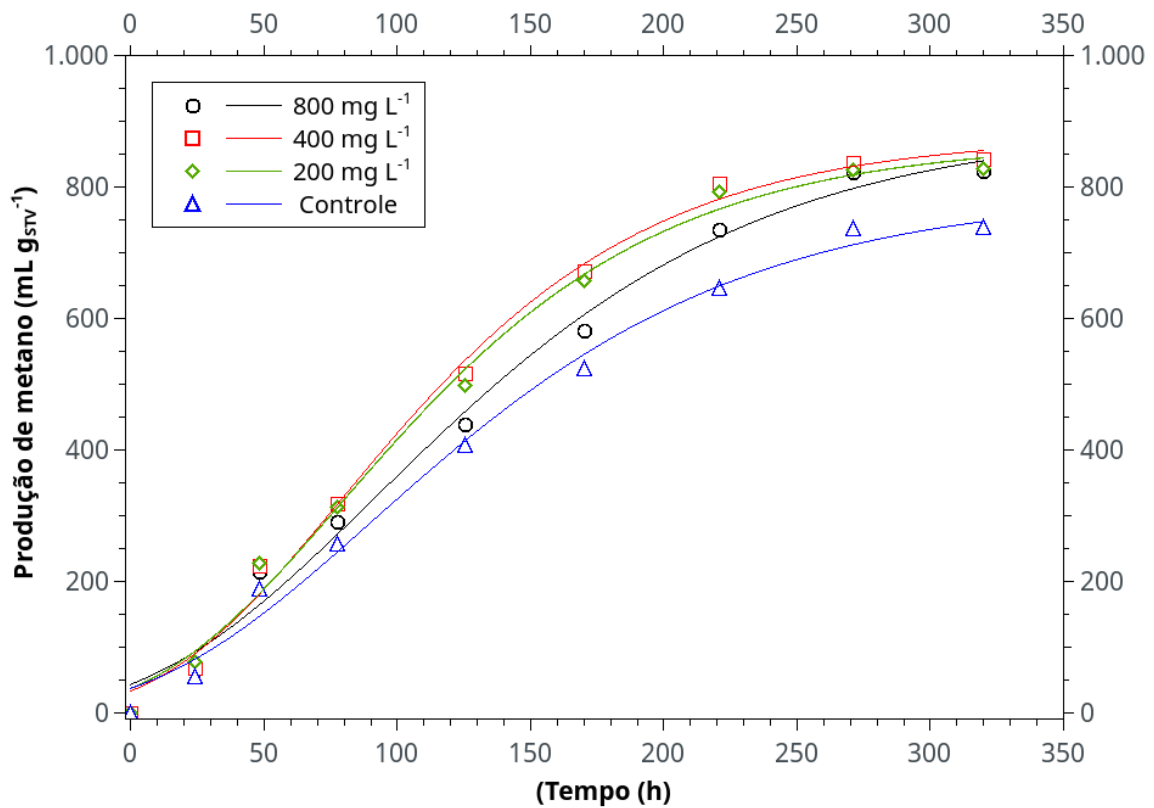


Figura 23: Volumes acumulados de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$

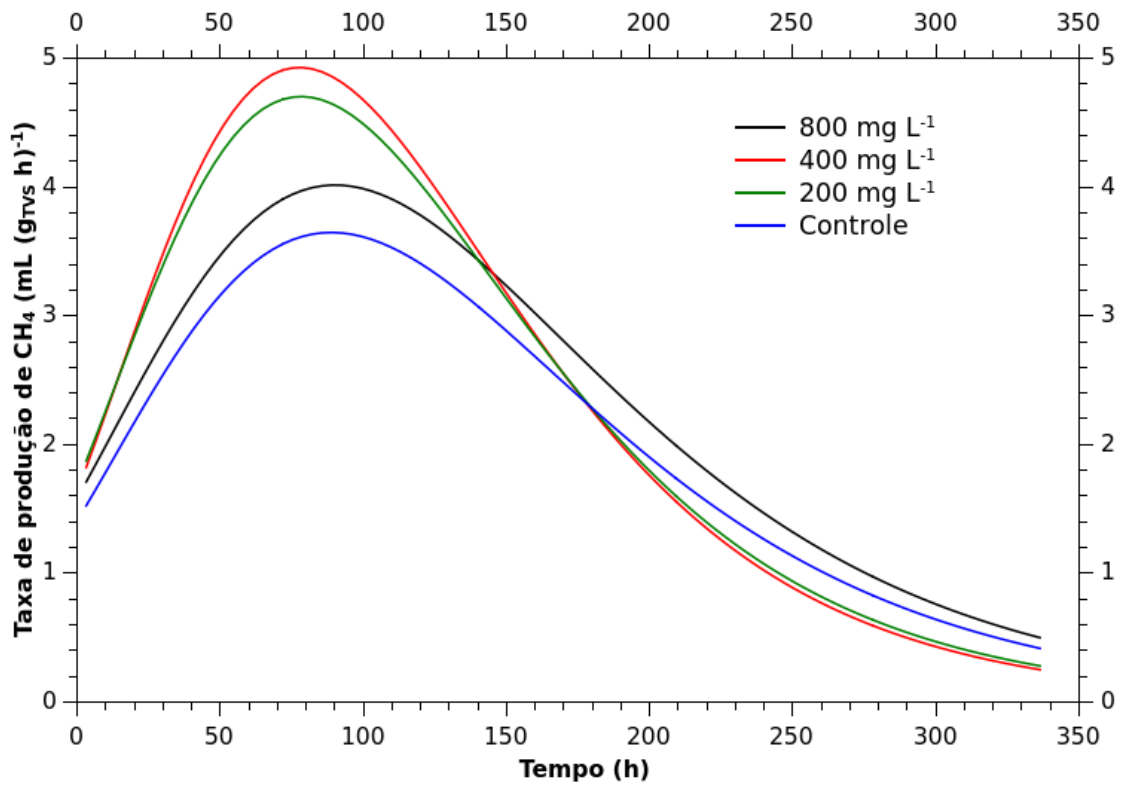


Figura 24: Taxas de produção de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$

A Tabela 13 apresenta os valores obtidos por meio do ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático de Gompertz (modificado), descrito pela Equação 11.

Tabela 13: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$

Ensaio	Concentração de nanopartículas de $\text{Fe}^0$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Potencial de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL gSTV}^{-1}$ )	Taxa máxima de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL (gSTV h)}^{-1}$ )	Instante de máxima produção de $\text{CH}_4$ (h)
Controle	0	792,6	3,6	89
1	200	869,8	4,7	76
2	400	877,6	4,9	70
3	800	895,9	4,0	92

A produção de metano nos ensaios realizados apresentou comportamentos distintos, como é possível observar pelas Figuras 23 e 24 e pela Tabela 13. Em todos os ensaios com adição de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  foram verificadas produções de metano superiores ao reator Controle. Os ensaios montados com 200, 400 e 800  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^0$  de geraram, respectivamente, 9,7%, 10,7% e 13,0% mais metano quando comparados ao reator Controle.

Apesar dos aumentos reduzidos na produção acumulada de metano, foi verificado que a taxa máxima de produção de metano no reator contendo 400  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^0$  foi 36% superior à taxa máxima do reator controle. Além disso, a adição de 200 e 400  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^0$  adiantou o período de máxima de produção de metano. Por exemplo, o reator suplementado com 400  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^0$  atingiu a taxa máxima de produção de biogás após 70 horas de operação, ou seja, cerca de 20 horas antes reator de controle (Tabela 13, Figura 24). Isto indicou uma maior eficiência dos reatores contendo  $\text{Fe}^0$  durante o período de maior produção de metano (entre 50 e 100 horas de operação) e, possivelmente, um efeito benéfico sobre a fase hidrolítica da digestão anaeróbia. Wang et al. (2018), por exemplo, sugeriram que o  $\text{Fe}^0$  atua diretamente na decomposição de lipossacarídeos e proteínas, podendo até levar à lise de algumas células microbianas, liberando proteínas e outros nutrientes que estimulam o crescimento das populações microbianas resistentes, além de fornecerem substratos hidrolisados para as fases acidogênicas e acetogênicas. Provavelmente, tal fato pode ter ocorrido durante a operação dos reatores contendo  $\text{Fe}^0$ , levando a taxas mais elevadas de geração de metano.

A Figura 25 mostra a eficiência percentual de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$ .

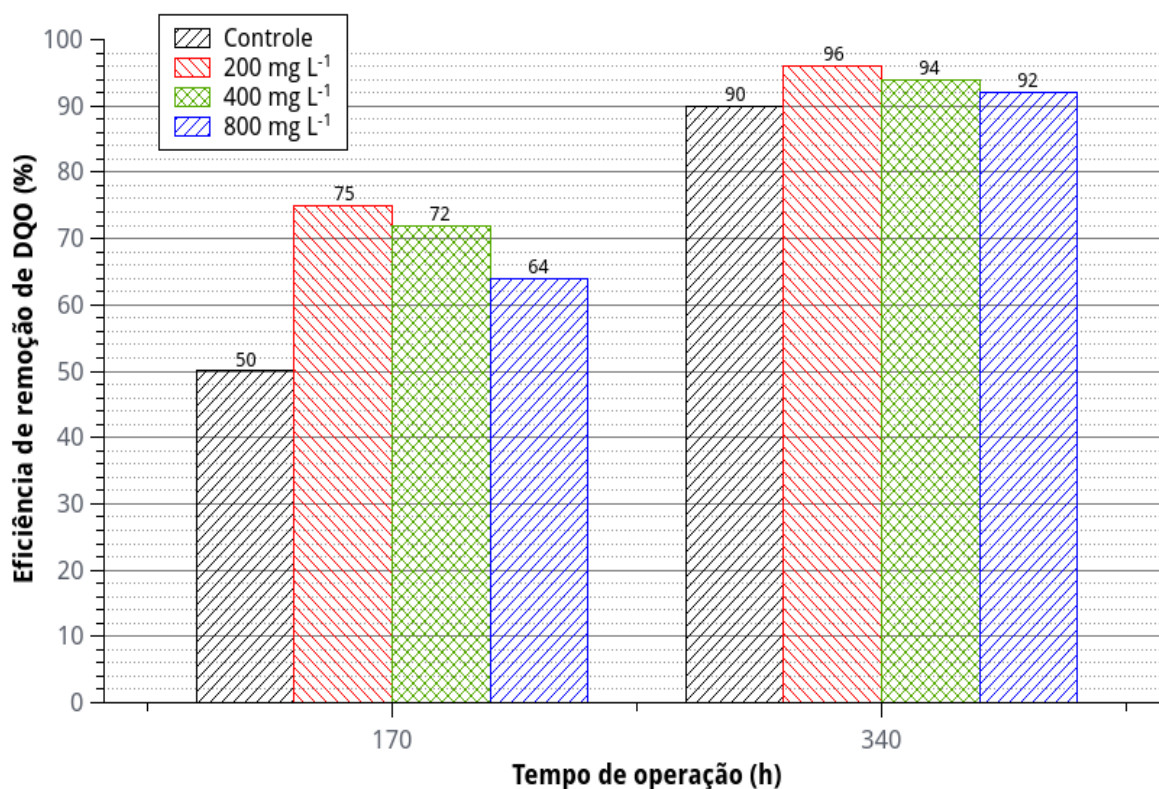


Figura 25: Eficiência de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de Fe<sup>0</sup>

A remoção de DQO ocorreu rapidamente nas primeiras 170 horas (7 dias) de ensaio. Entretanto, transcorridas 340 horas (14 dias) de ensaio, a remoção de DQO foi superior a 90% para todas as concentrações de nanopartículas de Fe<sup>0</sup>. Destaca-se que os reatores contendo 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>0</sup> foram cerca de 50% mais eficiente na remoção de DQO, se comparados com o reator Controle, nas primeiras 170 horas de operação (Figura 25).

A eficiência de remoção de DQO não foi equivalente ao aumento do volume de metano produzido, com adição das nanopartículas de Fe<sup>0</sup>. Provavelmente, as nanopartículas de Fe<sup>0</sup> interferiram nas rotas metabólicas dos microrganismos, favorecendo a produção de CO<sub>2</sub> sem, no entanto, alterar significativamente as taxas de produção de CH<sub>4</sub>.

Em termos de volume de CH<sub>4</sub> por grama de DQO removida, o reator controle e os ensaios com 200, 400 e 800 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>0</sup> geraram, respectivamente, 266, 274, 282 e 295 mL de CH<sub>4</sub> g<sub>DQO</sub><sup>-1</sup>. Tais valores são compatíveis com os resultados encontrados nos estudos com ênfase em digestão anaeróbia de glicerol bruto, alistados na Tabela 7, a saber: 292 mL g<sub>DQO</sub><sup>-1</sup> (Siles

López et al., 2009); 356 mL  $\text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$  (Siles López et al., 2010); 358 mL  $\text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$  (Baba et al., 2013).

#### 5.4.3 FERRITA DE NÍQUEL

A Figura 26 apresenta o gráfico com produção acumulada de  $\text{CH}_4$  (mL  $\text{g}_{\text{STV}}^{-1}$ ) para os ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de magnetita ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ), após transcorridas 340 horas (14 dias) desde o início dos ensaios. Em complemento, a Figura 27 apresenta a evolução das taxas de produção de  $\text{CH}_4$  (mL  $(\text{g}_{\text{STV}} \text{h})^{-1}$ ) obtida por meio da Equação 14.

São condições iniciais para estes experimentos: pH = 8,0 e 35  $\text{g}_{\text{DQO}} \text{L}^{-1}$ .

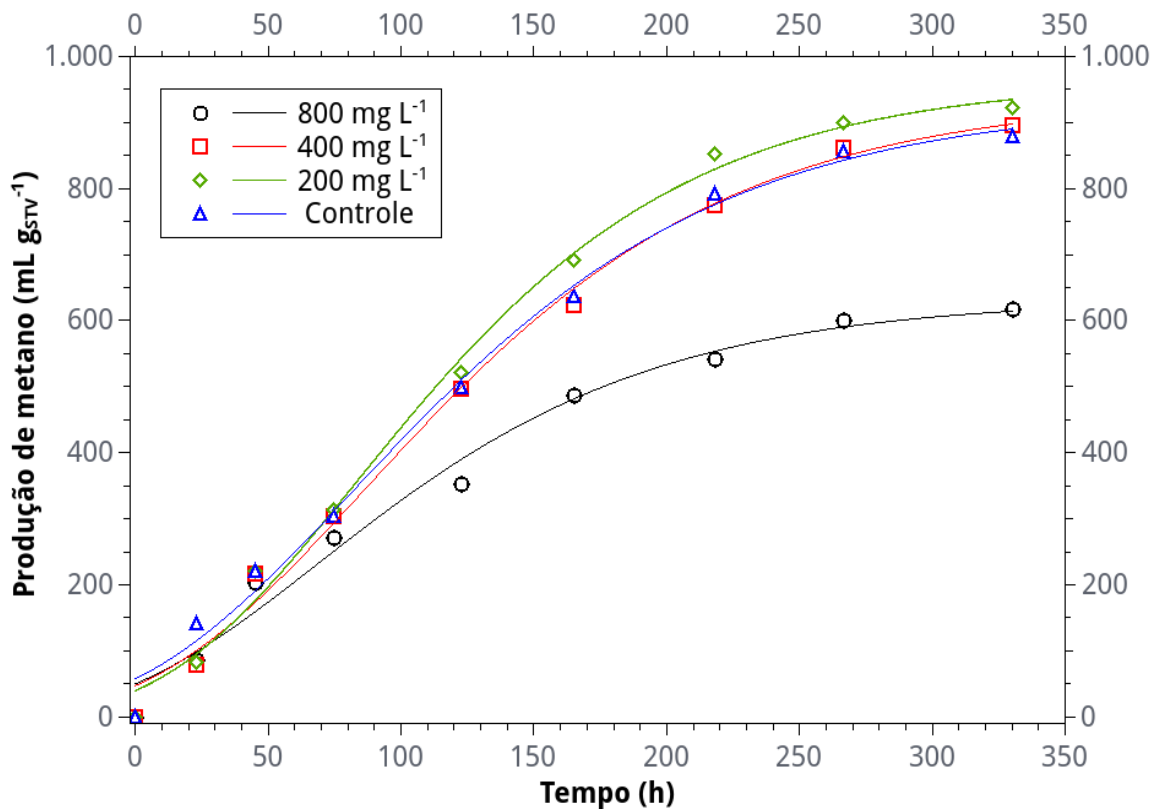


Figura 26: Volumes acumulados de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$



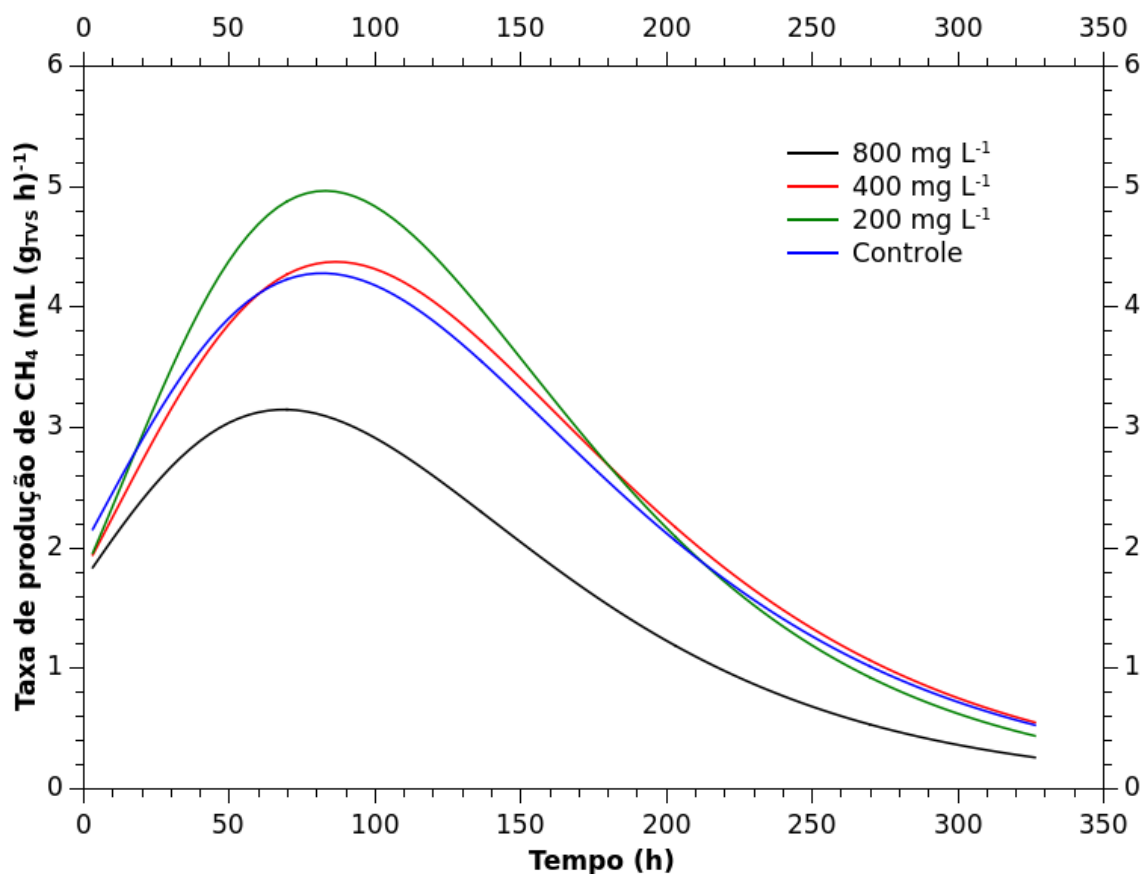


Figura 27: Taxas de produção de metano em ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$

A Tabela 14 apresenta os valores obtidos por meio do ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático de Gompertz (modificado), descrito pela Equação 11.

Tabela 14: Potencial, taxa máxima e instante de máxima produção de metano para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$

Ensaio	Concentração de nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Potencial de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL gSTV}^{-1}$ )	Taxa máxima de produção de $\text{CH}_4$ ( $\text{mL (gSTV h)}^{-1}$ )	Instante de máxima produção de $\text{CH}_4$ (h)
Controle	0	931,4	4,2	80
1	200	965,1	5,0	84
2	400	940,2	4,4	90
3	800	632,5	3,1	63

Nos ensaios contendo 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram verificadas produções acumuladas de metano equivalentes às do reator Controle, isto é, nestas concentrações as nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> não produziram efeitos positivos ou negativos sobre a produção de metano. Entretanto, concentrações de 800 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> geraram redução de 32% na produção acumulada de metano, se comparado com os reatores controle.

Observa-se pela Figura 27 que a adição de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> causou poucas mudanças nos períodos em que ocorreram as maiores taxas de produção de CH<sub>4</sub>, com exceção dos reatores suplementados com 800 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, no qual houve adiantamento do instante de máxima geração de metano. Para os demais reatores (controle, 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) o instante de máxima produção de CH<sub>4</sub> ocorreu entre 80 e 90 horas de operação e apenas o reator suplementado com 200 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> apresentou taxa máxima de produção de CH<sub>4</sub> cerca de 20% superior ao controle.

A Figura 28 mostra a eficiência percentual de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

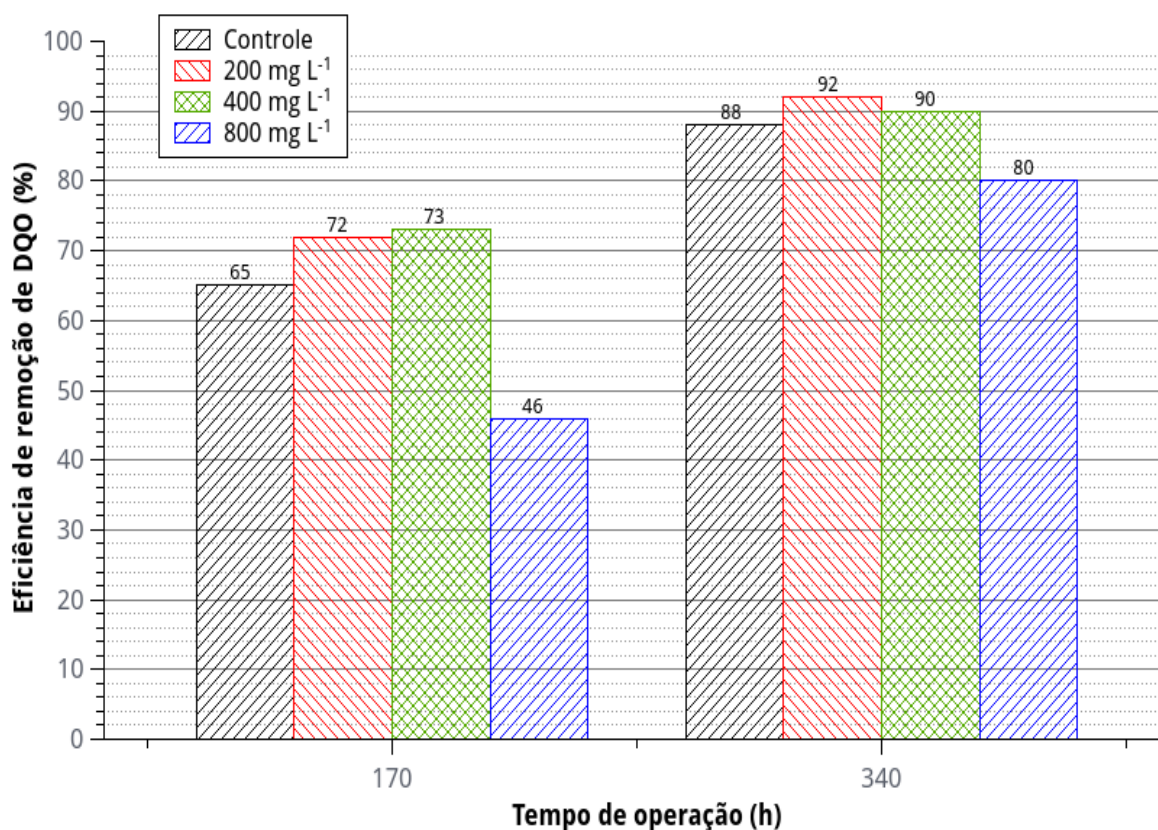


Figura 28: Eficiência de remoção de DQO para ensaios com diferentes concentrações de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Observa-se que os reatores contendo 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram cerca de 11% mais eficiente na remoção de DQO, se comparado com o Controle, nas primeiras 170 horas (7 dias) de ensaio, enquanto os reatores contendo 800 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram 29% menos eficientes no mesmo período.

Em termos de volume de CH<sub>4</sub> por grama de DQO removido, o reator controle e os ensaios com 200, 400 e 800 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> geraram, respectivamente, 274, 272, 271 e 205 mL de CH<sub>4</sub> g<sub>DQO</sub><sup>-1</sup>. Tais valores são compatíveis com os resultados encontrados nos estudos com ênfase em digestão anaeróbia de glicerol bruto, alistados na Tabela 7, a saber: 292 mL g<sub>DQO</sub><sup>-1</sup> (Siles López et al., 2009); 356 mL g<sub>DQO</sub><sup>-1</sup> (Siles López et al., 2010); 358 mL g<sub>DQO</sub><sup>-1</sup> (Baba et al., 2013).

Os dados das Figuras 26 a 28 apontam que em baixas concentrações, até 400 mg L<sup>-1</sup>, as nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> não tiveram efeito importante na produção de metano e na remoção de DQO. Entretanto, na concentração mais elevadas, de 800 mg L<sup>-1</sup>, observou-se redução da eficiência de produção de CH<sub>4</sub>, evidenciada pela diminuição do volume acumulado e pelas taxas reduzidas de produção em função do tempo.

As Figuras 29 e 30 apresentam os dados e gráficos referentes às análises cromatográficas do gás presente no *headspace* do reator controle e do reator contendo 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Estas análises, realizadas 160 horas após o início dos ensaios, indicaram a predominância do gás metano no *headspace* de ambos os reatores. Foram verificados 56,6% de CH<sub>4</sub> e 35,7% de CO<sub>2</sub> no reator controle. Entretanto, no reator contendo 200 mg L<sup>-1</sup> de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram verificados 60,3% de CH<sub>4</sub> e 36,1% de CO<sub>2</sub>. Assim, a adição de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> não gerou importantes alterações nos percentuais de metano e dióxido de carbono nos reatores.

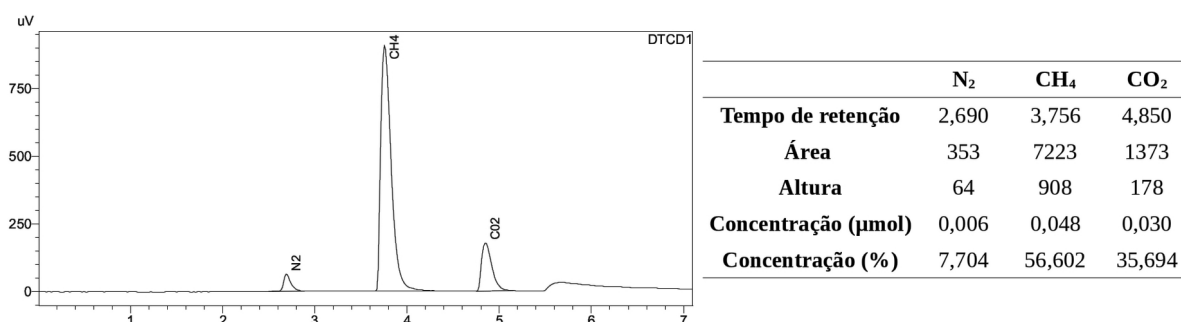


Figura 29: Cromatograma e tabela de picos para o ensaio controle após 160 h

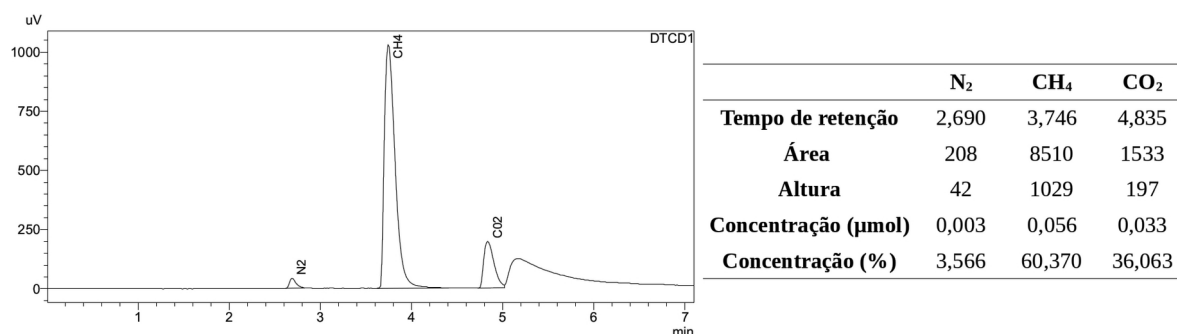


Figura 30: Cromatograma e tabela de picos para o ensaio com 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> após 160 h

Importante observar que, devido ao uso de solução tampão bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), as frações de CO<sub>2</sub> quantificadas pelas análises cromatográficas não representam apenas o dióxido de carbono de origem biológica.

A Tabela 15 sintetiza os resultados obtidos no presente trabalho em relação aos volumes e taxas de produção de CH<sub>4</sub> e remoção de DQO.

Tabela 15: Efeito relativo da adição de nanopartículas sobre a dinâmica de produção de CH<sub>4</sub> e consumo de matéria orgânica

Nanopartícula	Concentração de nanopartículas	Produção acumulada de CH <sub>4</sub> , em relação ao Controle (%)	Taxa máxima de produção de CH <sub>4</sub> , em relação ao Controle (%)	Remoção de DQO nas primeiras 170 horas de operação, em relação ao Controle (%)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	200	+ 49,8 %*	+ 25,7	+ 10,2
	400	+ 28,5 %	+ 17,1	+ 25,4
	800	+ 26,0 %	+ 20,0	+ 8,5
Fe <sup>0</sup>	200	+ 9,7	+ 30,6	+ 50,0
	400	+ 10,7	+ 36,1	+ 44,0
	800	+ 13,0	+ 11,1	+ 28,0
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	200	+ 3,6	+ 16,3	+ 10,8
	400	+ 0,9	+ 2,3	+ 12,3
	800	- 32,0	- 27,9	- 29,2

\* O sinal (+) indica acréscimo em relação ao controle; o sinal (-) indica decréscimo em relação ao controle.

Melhoras na eficiência de produção de  $\text{CH}_4$  e consumo de substrato foram verificadas nos ensaios contendo nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}^0$ . Destacam-se os aumentos de 49,8% na produção acumulada de  $\text{CH}_4$  nos reatores com  $200 \text{ mg-Fe}_3\text{O}_4 \text{ L}^{-1}$ , de 36% da taxa máxima de produção de  $\text{CH}_4$  nos reatores com  $400 \text{ mg-Fe}^0 \text{ L}^{-1}$  e de 50% na remoção de DQO nas primeiras 170 horas de operação nos reatores com  $200 \text{ mg-Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ .

Dentre os estudos que avaliaram a influência de nanopartículas na digestão anaeróbia (referenciados na Tabela 2), Casals et. al. (2014) obtiveram o maior aumento de produção de metano, 180%, utilizando nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Entretanto, este estudo utilizou celulose cristalina, na concentração de  $3,4 \text{ g L}^{-1}$  ( $\approx 7 \text{ g}_{\text{DQO}} \text{ L}^{-1}$ ), como substrato único. Em outro estudo, Chen et al. (2018) avaliou a influência de nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  na digestão anaeróbia em meio nutricional ideal para cultivo de microrganismos anaeróbios (peptona, extrato de carne e glicose), com  $1 \text{ g}_{\text{DQO}} \text{ L}^{-1}$ , obtendo 30% de aumento na produção de metano. Em ambos os casos, apesar dos resultados significativos, não foram realizados testes em resíduos reais e sem a adição de nutrientes, como no presente estudo..

Nos demais trabalhos referenciados na Tabela 2, os principais substratos (e fonte de inóculo) foram estrume animal e lodo de esgoto, ambos resíduos reais. Nestes casos, nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}^0$  e  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  aumentaram a produção de metano em 30 a 120%, resultados compatíveis com os obtidos no presente trabalho.

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DOS CONSÓRCIOS ANAERÓBIOS

O efeito das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e do glicerol bruto sobre os consórcios de microrganismos anaeróbios presentes nos reatores foi avaliado nas amostras: (1) inóculo e (2) reator (alimentado com glicerol bruto e suplementado com  $200 \text{ g L}^{-1}$  de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , após 170 horas de operação), conforme descrito anteriormente.

A Tabela 16 apresenta os resultados relacionados à biodiversidade nas amostras coletadas. A OTU (unidade taxonômica operacional) é definida como um cluster composto por sequências de microrganismos com pelo menos 97% de similaridade estudados em cada amostra; o índice de Shannon indica a diversidade microbiana e o índice Chao-1 representa a riqueza da comunidade microbiana (Rodrigues et al., 2020).

Tabela 16: Valores quantitativos e estatísticos de biodiversidade nas amostras coletadas

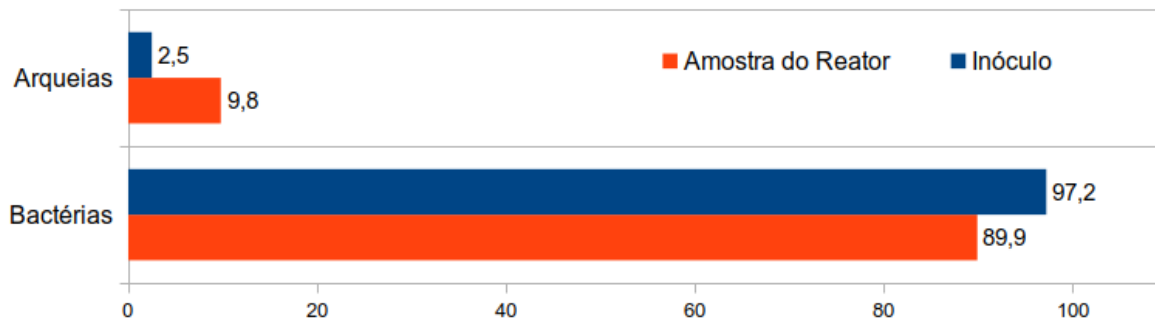
Amostra	Número de Sequências	OTU	Shannon	Chao-1
Inóculo	221603	1776	8.058	1736.851
Reator	266184	1427	6.363	1444.720

A redução no número de OTUs observada na amostra do reator provavelmente se deve à presença de glicerol bruto e seus compostos tóxicos. Por outro lado, o número de sequências na amostra do reator é maior do que no inóculo, indicando que alguns microrganismos foram selecionados e beneficiados pelas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e/ou pelo glicerol bruto.

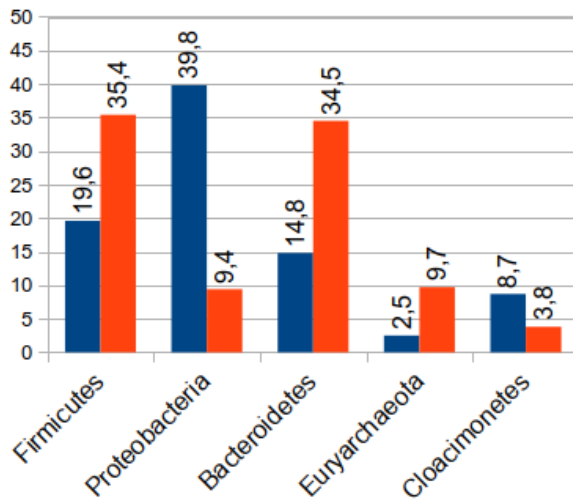
A diferença nos índices de Shannon indica que ocorreu a seleção de microrganismos que foram capazes de sobreviver às condições operacionais impostas, inclusive pela adição de glicerol bruto, além da concentração elevada de ferro no meio. A riqueza da comunidade microbiana dada pelo estimador Chao-1 também diminuiu na amostra do reator quando comparada ao inóculo. Isto confirmou a seleção de microrganismos durante a operação do reator alimentado com glicerol bruto e suplementado com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

A redução da diversidade microbiana na amostra do reator deve-se à seleção de grupos específicos capazes de sobreviver ao glicerol bruto, sugerindo que parte das populações de bactérias e arqueias foram favorecidas, inibindo outras populações. Ajayi-Banji & Rahman (2021) observaram tendências semelhantes na modificação dos índices de Shannon e Chao-1 no início e no término dos experimentos, (7,89 e 618,77) e (5,78 e 368,87) respectivamente, em reatores anaeróbios de estado sólido alimentados com esterco fresco e palha de milho, inoculado com lodo mesofílico extraído de digestor anaeróbio tratando efluentes, e suplementado com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (15-20 nm). Por outro lado, Veras et al. (2019) observaram alterações da diversidade e riqueza das comunidades microbianas em um reator UASB alimentado com glicerol bruto, proveniente de uma planta industrial de reciclagem de óleo de cozinha e produção de biodiesel, inoculado com lodo granular obtido de um reator UASB de escala laboratorial e adaptado ao consumo de glicerol. Os autores observaram os índices de Shannon e Chao-1 aumentaram respectivamente de 1,63 e 499, no inóculo, para 2,23 e 1341 na amostra do reator.

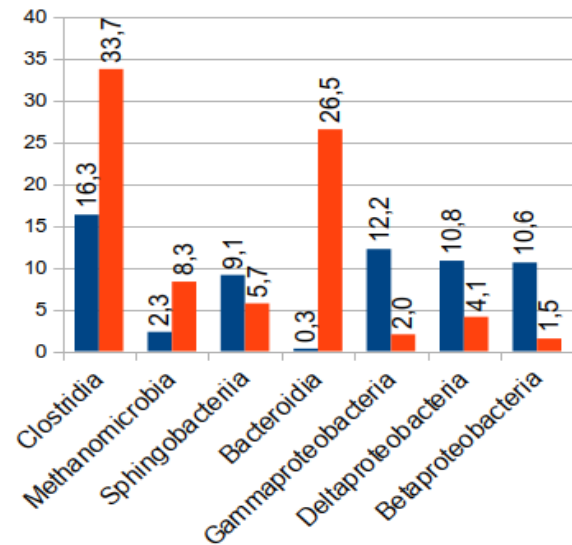
O resultado da análise taxonômica, em termos de abundância relativa de sequências, das comunidades microbianas predominantes é mostrado na Figura 31. Resultados taxonômicos mais abrangentes e detalhados são apresentados nos Anexos 4 a 7.



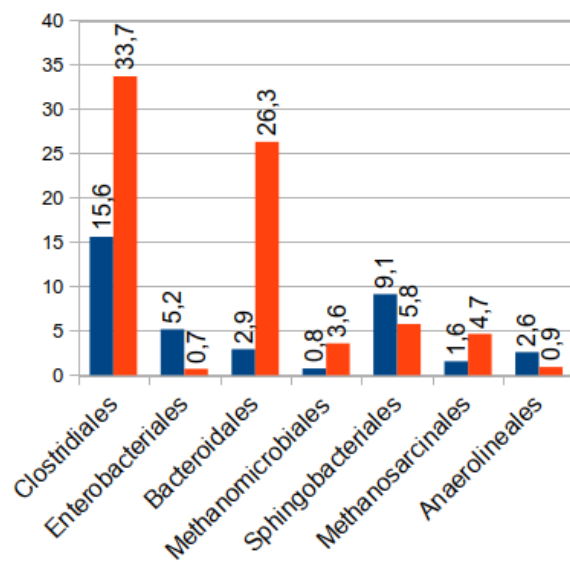
a) Abundância relativa de Domínios (%)



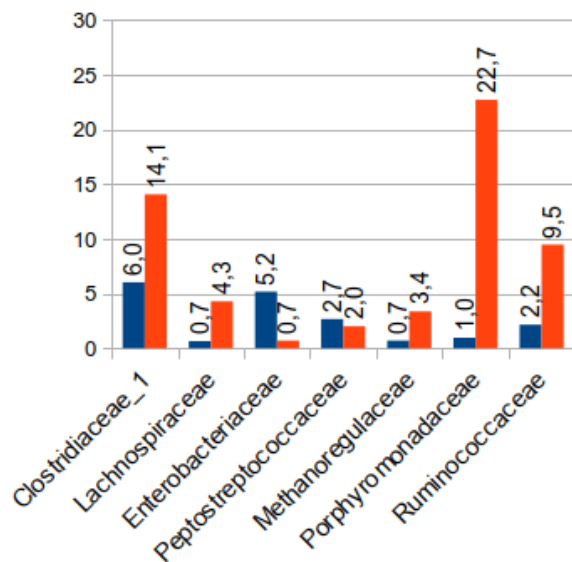
b) Abundância relativa de Filos (%)



c) Abundância relativa de Classes (%)



d) Abundância relativa de Ordens (%)



e) Abundância relativa de Famílias (%)

Figura 31: Abundâncias relativas de microrganismos no inóculo e na amostra retirada de reator suplementado com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  após 170 horas de operação em relação aos: (a) Domínios; (b) Filos; (c) Classes; (d) Ordens e (e) Famílias.

A análise taxonômica mostrou abundância relativa do domínio *Bacteria* de 97,2% e 89,9%, respectivamente, para amostras de inóculo e do reator. O domínio *Archaea* abrangia 2,5% e 9,7% das amostras de inóculo e reator, respectivamente.

Na **amostra de inóculo**, as populações bacterianas mais abundantes ao nível do filo foram *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Cloacimonetes*, representando 39,6%, 19,6%, 14,8% e 8,7% de todas as sequências, respectivamente. Muitas bactérias envolvidas na digestão anaeróbia de glicose, propionato, butirato e acetato são relatadas como pertencentes ao filo *Proteobacteria* (Guo et al., 2015).

*Clostridia*, *Bacilli* e *Selenomonadales* representaram as classes majoritárias dentro o filo *Firmicutes*, representando, respectivamente, 83%, 10% e 7% dentre todas as sequências de *Firmicutes* no inóculo. A maioria dos membros pertencentes ao filo *Firmicutes* são bactérias sintróficas que podem converter vários substratos em ácidos graxos voláteis em digestores anaeróbios que tratam resíduos orgânicos (Khatami et al., 2021).

*Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* e *Ruminococcaceae* foram as famílias dominantes, com abundâncias relativas de 37%, 16%, 13% e 9% dentre todas as sequências de *Clostridia*, respectivamente. A predominância da classe *Clostridia* na amostra de inóculo está associada a taxas elevadas de hidrólise e fermentação de glicerol bruto em ácidos graxos voláteis ocorrida no digestor anaeróbio estudado, o que foi confirmado pelos dados de desempenho do reator.

Dentre o filo *Bacteroidetes*, as principais classes identificadas foram *Sphingobacteriales* e *Bacteroidia*, representando 62% e 20% em abundâncias relativas, respectivamente.

Nota-se que não foram encontradas no inóculo populações abundantes de bactérias reconhecidamente participantes de processos de transferência direta de elétrons interespecies – DIET, especialmente bactérias pertencentes ao gênero *Geobacter* (Wang et al., 2021). Entretanto, diversos gêneros de bactérias doadoras de elétrons foram encontradas no inóculo em menor abundância relativa: *Syntrophomonadaceae* (0,7% do total de bactérias), *Synergistacea* (1%), *Porphyromonadaceae* (1%), *Ruminococcaceae* (2%) e *Syntrophaceae* (3%) (Tabela 1). Provavelmente tais bactérias anaeróbias estiveram envolvidas em processos DIET no presente estudo.

*Metanomicrobia* foi a principal classe no domínio *Archaea*, com 93% de todas as sequências de *Archaea*, seguidas por *Methanobacteriaceae* (5%) e *Thermoplasmatales* (2%). *Methanosaeta* e *Methanoregulaceae* foram as famílias predominantes, respondendo por 67% e 30% de todas as sequências de *Methanomicrobia* no inóculo. Além disso, a família *Methanosarcinaceae* corresponde a apenas 0,3% da *Methanomicrobia* no inóculo. A predominância



de *Methanomicrobia* provavelmente esteve relacionada com a atividade metanogênica elevada do inóculo.

No reator alimentado com glicerol bruto e suplementado com 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, após 170 h de operação (**amostra do reator**), os filos predominantes dentre as populações bacterianas foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Cloacimonetes*, representando 35,4%, 34,5%, 9,4% e 3,8% de todas as sequências, respectivamente.

Dentre o filo *Firmicutes*, a classe *Clostridia* tornou-se a mais abundante, correspondendo a 95% de todas as sequências de *Firmicutes* nas amostras do reator, restando apenas 3% de *Selenomonadales* e 1% de *Bacilli*. As famílias dominantes dentro da classe de *Clostridia* na amostra do reator permanecem sendo *Clostridiaceae* (42% de todos os *Clostridia*), seguido por *Ruminococcaceae* (28%), *Lachnospiraceae* (13%) e *Peptostreptococcaceae* (6%).

Também foram observadas mudanças consideráveis nas classes dentro do filo *Bacteroidetes*: a classe *Bacteroidia* tornou-se mais abundante do que *Sphingobacteriia*, respondendo por 67% e 17% de todas as sequências de *Bacteroidetes* na amostra do reator, respectivamente. É importante notar que a família *Porphyromonadaceae*, que correspondia a apenas 1% das sequências no inóculo, elevou sua abundância relativa para 22,7% de todas as sequências da amostra do reator (chegando a 86% das sequências de *Bacteroidia* na amostra do reator). Ou seja, o seu favorecimento foi claramente demonstrado durante a operação do reator com a adição das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e do glicerol bruto. Certamente, as condições operacionais favoreceram a família *Porphyromonadaceae* durante a operação do reator.

Além disso, de acordo com Hahnke et al. (2015), algumas linhagens de *Porphyromonadaceae* produzem várias enzimas envolvidas na degradação de carboidratos complexos e proteínas e possuem genes que catalisam a produção de ácidos graxos voláteis e acetato. Assim, a família *Porphyromonadaceae*, bem como outras bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes*, desempenharam papel importante nos processos de hidrólise, fermentação e produção ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> durante a digestão anaeróbia e geração de biometano (Traversi et al., 2012).

Em relação a algumas famílias de bactérias relacionadas aos processos de DIET, destacaram-se as abundâncias relativas crescentes destas populações do inóculo para a amostra do reator: *Ruminococcaceae* (2,2% para 9,5%), *Porphyromonadaceae* (1% para 22,7%) e *Clostridiaceae* (6% para 14,1%).

De acordo com Chen et al. (2022), a magnetita e carvão ativado formam os meios materiais condutores necessários para que haja DIET entre as bactérias redutoras de ferro do gênero *Ruminococcaceae* e as arqueias dos gêneros *Methanosaeta* e *Metanosarcina*. Yu et al.

(2021) observam que bactérias do gênero *Porphyromonadaceae* são importantes organismos acetogênicos capazes de doar elétrons por meio de carvão ativado para arqueais do gênero *Methanobacterium*. Hu et al. (2017), por sua vez, demonstraram que bactérias da espécie *Clostridium sensu stricto* (pertencentes à família *Clostridiaceae*) transferem elétrons para arqueias do gênero *Methanosaeta* por meio de nanofios de anilina. Com base nestes estudos, é possível inferir a ocorrência de DIET neste trabalho por meio das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e de bactérias das famílias *Ruminococcaceae*, *Porphyromonadaceae* e *Clostridiaceae*.

Outras bactérias relacionadas com processos de DIET não tiveram grandes alterações do inoculo para a amostra do reator em suas abundâncias relativas: *Syntrophomonadaceae* (0,7% para 0,5%), *Synergistacea* (1% para 2%), e *Syntrophaceae* (3% para 2%). Entretanto, vale ressaltar a permanência de tais populações que certamente estiveram envolvidas nos processos DIET, principalmente durante a operação dos reatores alimentados com as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , conforme descrito anteriormente.

*Methanomicrobia* continua a ser a principal classe no domínio *Archaea*, representando 85% de todas as sequências de *Archaea* no inoculo, seguido por *Methanobacteriaceae* (10%) e *Thermoplasmatales* (5%). Foram observadas pequenas alterações nas famílias dentro da classe *Metanomicrobia*: as ordens *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* tiveram suas abundâncias relativas aumentadas proporcionalmente ao domínio *Archaea*, passando, respectivamente, de 0,7% e 2,0% de todas as sequências do inoculo para 4,0% e 5,0% de todas as sequências na amostra do reator. Da mesma forma, *Methanosaeta*, *Methanoregulaceae* e *Methanosarcinaceae* foram as famílias predominantes, representando 53,0%, 41,0% e 3,0% de todas as arqueias pertencentes à classe *Methanomicrobia* no inoculo.

Comparando a comunidade microbiana do inoculo e da amostra do reator, verificou-se que as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e o glicerol bruto modificaram as populações bacterianas e de arqueias com alterações nos processos bioquímicos envolvidos na digestão anaeróbia. Foi notável o aumento da população dentro do filo de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e a diminuição da população de *Proteobacteria*.

Desta forma, a seleção de bactérias fermentativas (*Firmicutes* e *Bacteroidetes*) foi favorecida em detrimento das bactérias anaeróbias facultativas (*Proteobacteria*). As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  favoreceram a remoção do glicerol bruto pela comunidade bacteriana com consequente produção de ácidos orgânicos,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  para geração de metano pelas arqueias metanogênicas.

A abundância relativa elevada das ordens *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* indicaram uma melhora em ambos os processos metanogênicos: metanogênese hidrogeno-

trófica (a partir de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>), realizada por *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, e metanogênese acetoclástica, realizada apenas por *Methanosarcinales* (Enzmann et al., 2018). Destaca-se ainda as abundâncias relativas mais elevadas nas famílias *Methanosaeta* (de 2% dentre todas as sequências do inóculo para 4% das sequências da amostra do reator) e *Methanobacterium* (de 0,1% dentre todas as sequências do inóculo para 1% das sequências da amostra do reator).

Além disso, o aumento da abundância relativa das populações de bactérias doadoras de elétrons, em especial das famílias *Ruminococcaceae*, *Porphyrimonadaceae* e *Clostridiaceae*, bem como das populações de arqueiasceptoras de elétrons, especialmente as famílias *Methanosaeta* e *Methanobacterium*, são evidências indiretas de que a suplementação com 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foi capaz de promover a transferência direta de elétrons interespecíficas – DIET.

A Figura 32 apresenta uma possível rota de digestão do glicerol para o presente estudo. São indicados os principais microrganismos presentes na amostra do reator e a provável função de cada um deles nas etapas de digestão anaeróbia do glicerol bruto.

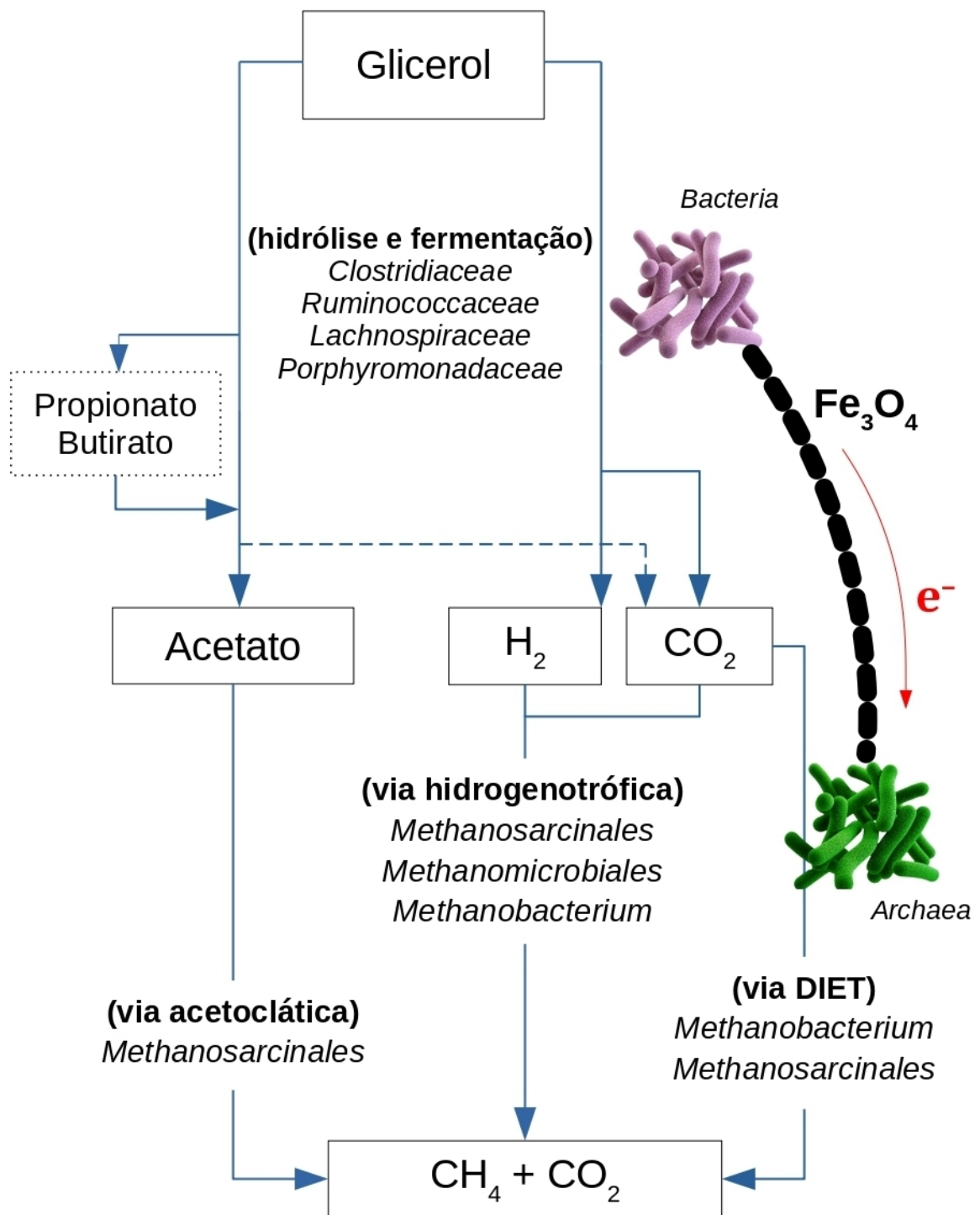


Figura 32: Possível rota metabólica baseada nos microrganismos identificados na amostra do reator suplementado com 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> após 170 horas de operação

Bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes*, com destaque para a família *Porphyromonadaceae*, assim como bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, especialmente as famílias *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, participaram dos processos de hidrólise e fermentação (acidogênese e acetogênese) do glicerol e das demais moléculas orgânicas presentes no substrato, bem como da oxidação dos produtos intermediários, tais como butirato e propionato. Também participaram das fases hidrolíticas e fermentativas as bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Cloacimonetes*, *Synergistaceae*, *Actinobacteria*, dentre outros filos menos abundantes no reator e não relacionados na Figura 32.

Arqueias pertencentes às famílias *Methanosaeta* e *Methanosarcinaceae* (ordem *Methanosarcinales*) produziram  $\text{CH}_4$  por meio da metabolização do acetato produzido pelas bactérias acetogênicas. Arqueias pertencentes às ordens *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* e *Methanobacterium* produziram  $\text{CH}_4$  a partir do  $\text{CO}_2$  produzido durante as fases hidrolíticas e fermentativas, via metanogênese hidrogenotrófica.

$\text{CH}_4$  também foi produzido a partir do  $\text{CO}_2$  por meio de transferência direta de elétrons interespecies – DIET auxiliada pelas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Com base em estudos recentes (Tabela 1), inferiu-se que bactérias pertencentes às famílias *Ruminococcaceae*, *Porphyromonadaceae* e *Clostridiaceae* participaram do processo de DIET como doadoras de elétrons enquanto arqueias pertencentes às ordens *Methanosarcinales* e *Methanobacterium* atuaram como receptoras de elétrons.

Portanto, com base nas análises dos consórcios microbianos anaeróbios, associados à remoção de DQO e maior eficiência de produção de  $\text{CH}_4$  em reatores suplementados com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , foi comprovada a ação de nanopartículas de óxido de ferro como otimizador biológico na digestão anaeróbia do glicerol bruto, selecionando bactérias fermentativas e populações de arqueias metanogênicas que, possivelmente, promoveram a transferência direta de elétrons interespecies – DIET.

## 6 CONCLUSÕES

- Os métodos desenvolvidos para síntese de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) geraram partículas de dimensões nanométricas, a saber:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – cerca de 20 nm;  $\text{Fe}^0$  – entre 50 e 100 nm;  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  – cerca de 100 nm.
- A adição de citrato ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$ ) durante a síntese teve efeito estabilizante e antiaglomerante em nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ).
- O lodo granular anaeróbio proveniente do tratamento de efluentes de abate avícola possui microrganismos adaptados e resistentes a concentrações elevadas de ferro.
- A eficiência na biodegradação do glicerol bruto foi elevada nos ensaios com nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ).
- Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ), nas concentrações de 200 a 800  $\text{mg L}^{-1}$ , têm efeito positivo na produção acumulada de metano, taxa máxima de produção de metano e remoção de DQO.
- Digestão do glicerol bruto suplementada com nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) selecionou bactérias fermentativas (*Firmicutes* e *Bacteroidetes*) em detrimento das bactérias anaeróbias facultativas (*Proteobacteria*), favorecendo a remoção do glicerol bruto pela comunidade bacteriana com consequente produção de ácidos orgânicos,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  para geração de metano pelas arqueias metanogênicas.
- Digestão do glicerol bruto suplementada com nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) favoreceu a permanência e enriquecimento das populações de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas, com destaque para os gêneros *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*.
- Suplementação com nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) evidencia indiretamente a promoção de transferência direta de elétrons interespecies – DIET, devido ao o enriquecimento de relativo das populações de bactérias doadoras de elétrons (*Ruminococcaceae*, *Porphyromonadaceae* e *Clostridiaceae*) e de arqueias aceptoras de elétrons (*Methanosaeta* e *Methanomicrobium*).
- Nanopartículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  não afetam (200 e 400  $\text{mg L}^{-1}$ ) ou têm efeito deletério (800  $\text{mg L}^{-1}$ ) quando aplicadas à digestão anaeróbia.
- Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e ferro zero-valente ( $\text{Fe}^0$ ) podem ser utilizadas como aditivos em processos de digestão anaeróbia do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel.

## SUGESTÕES PARA DAR CONTINUIDADE AO PRESENTE ESTUDO

- Utilização de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas com citrato em biodigestores contínuos ou em série;
- Síntese de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  com diferentes estabilizantes e novos ensaios de digestão anaeróbia de glicerol bruto em batelada;
- Síntese e utilização de carvão ativado granular dopado com nanopartículas à base de Fe em ensaios de digestão anaeróbia de glicerol bruto em batelada;
- Uso simultâneo de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}^0$  em ensaios de digestão anaeróbia de glicerol bruto em batelada;
- Realização de ensaios com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}^0$  e culturas puras de *Ruminococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Methanosaeta* e *Methanomicrobium*, visando melhor compreensão dos processos de DIET.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. S.; HASSANEEN, F. Y.; FAISAL, Y.; MANSOUR, M. S.; IBRAHIM, A. M.; ABO-ELFADL, S.; SALEM, H.G., ALLAM, N.K. Effect of Ni-Ferrite and Ni-Co-Ferrite nanostructures on biogas production from anaerobic digestion. *Fuel*, v. 254, p. 115673, 2019.

ABDELSALAM, E., SAMER, M., ATTIA, Y.A., ABDEL-HADI, M.A., HASSAN, H.E., BADR, Y. Influence of zero valent iron nanoparticles and magnetic iron oxide nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of manure. *Energy*, v. 120, p. 842-853, 2017.

ADAMES, L.V.; JACOBUS, A.P.; SAKAMOTO, I.K.; LAZARO, C.Z.; PIRES, L.O.; MAINTINGUER, S.I. Bioenergy recovery from anaerobic co-digestion of crude glycerol and domestic sewage in-series reactor: microbial characterization and system performance. *Bioenerg. Res.*, 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/paineis-dinamicos-da-anp/paineis-e-mapa-dinamicos-de-produtores-de-combustiveis-e-derivados/painel-dinamico-de-produtores-de-biodiesel>. Acessado em 06/05/2022. 2022a.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Metanol. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/metanol>. Acessado em 06/05/2022. 2022b.

AGUILAR-MORENO, G.S.; NAVARRO-CERÓN, E.; VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ-EUGENIO, G.; AGUILAR-MÉNDEZ, M.Á.; ESPINOSA-SOLARES, T. Enhancing methane yield of chicken litter in anaerobic digestion using magnetite nanoparticles. *Renew. Energy*, v. 147, p. 204–213, 2020.



AJAYI-BANJI, A.A.; RAHMAN, S. Efficacy of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles for enhancing solid-state anaerobic co-digestion: Focus on reactor performance and retention time. *Bioresour. Technol.*, v. 324, p. 124670, 2021.

ALI, A.; MAHAR, R.B.; SOOMRO, R.A.; SHERAZI, S.T.H. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles facilitated anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste for enhancement of methane production. *Energy Sources*, v. 39, p. 1815–1822. 2017.

AMEN, T.W., ELJAMAL, O., KHALIL, A.M., SUGIHARA, Y., MATSUNAGA, N. Methane yield enhancement by the addition of new novel of iron and copper-iron bimetallic nanoparticles. *Chem. Eng. Process*, v. 130, p. 253–261, 2018.

ANDERSON, I.; ULRICH, L.E.; LUPA, B.; SUSANTI, D.; PORAT, I.; HOOPER, S.D.; LYKIDIS, A.; SIEPRAWKA-LUPA, M.; DHARMARAJAN, L.; GOLTSMAN, E.; LAPIDUS, A.; SAUNDERS, E.; HAN, C.; LAND, M.; LUCAS, S.; MUKHOPADHYAY, B.; WHITMAN, W.B.; WOESE, C.; BRISTOW, J.; KYRPIDES, N. Genomic characterization of methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PLOS One*, v. 4, e5797, 2009.

ANDREAS, K.; RINGE, J.; SITTINGER, M.; BUSKE, N. Citrate-Coated Magnetite Nanoparticles Are Highly Efficient Agents for Magnetic Labeling of Human Mesenchymal Stem Cells. *Springer Proceedings in Physics*, v. 140, p. 363 – 364, 2012.

ALVES, I.R.F.S.; MAHLER, C.F.; OLIVEIRA, L.B.; REIS, M.M.; BASSIN, J.P. Assessing the use of crude glycerol from biodiesel production as an alternative to boost methane generation by anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Biomass and Bioenergy*, v. 143, p. 105831, 2020.

ALVES, I.R.F.S.; MAHLER, C.F.; OLIVEIRA, L.B.; REIS, M.M.; BASSIN, J.P. Investigating the effect of crude glycerol from biodiesel industry on the anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste in ternary mixtures. *Energy*, v. 241, p. 122818, 2022.

APHA-American Public Health Association. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. v.21, p. 1368, 2005.

AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME em lodos anaeróbios). *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 12, p. 192–201, 2007.

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

BARUA, S.; DHAR, B.R. Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.*, v. 244, p. 698–707, 2017.

BATSTONE, D.J.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C. Multidimensional modelling to investigate interspecies hydrogen transfer in anaerobic biofilms. *Water. Res.*, v. 40, p. 3099–3108, 2006.

BIEBL, H. ; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 52, p. 289–297, 1999.

BLASIUS, J.P.; CONTRERA, R.C.; MAINTINGUER, S.I.; ALVES DE CASTRO, M.C.A. Effects of temperature, proportion and organic loading rate on the performance of anaerobic digestion of food waste. *Biotechnol. Reports.*, v. 27, e00503, 2020.

BRASIL. Despacho nº 621, de 6 de agosto de 2019. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 07/08/2019, n. 151, s. 1 p. 72. 2019.

BRASIL. Lei 12.490, de 16 de setembro 2011. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 19/09/2011, p. 1. 2011.

BRASIL. Lei 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 25/09/2014, s. 1, p. 3. 2014.

BRASIL. Lei 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 24/03/2016, s. 1, p. 1. 2016.

BRASIL. Lei n.º 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 14/01/2005, n. 10, s. 1, p. 8. 2005.

BRASIL. Lei N° 9.478, de 6 de agosto de 1997. Dispõe sobre a política energética nacional, as atividades relativas ao monopólio do petróleo, institui o Conselho Nacional de Política Energética e a Agência Nacional do Petróleo e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 07/08/1997, s. 1, p. 16925. 1997.

BRASIL. Resolução n° 16, de 29 de outubro de 2018. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 08/11/2018, n. 215, s. 1, p. 2. 2018.

CASALS, E.; BARRENA, R.; GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, E.; DELGADO, L.; BUSQUETS-FITÉ, M.; FONT, X.; ARBIOL, J.; GLATZEL, P.; KVASHNINA, K.; ET AL. Programmed iron oxide nanoparticles disintegration in anaerobic digesters boosts biogas production. *Small*, v. 10, p. 2801–2808, 2014.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.*, v. 7, p. 335–336, 2010.

CHEN, J. L.; STEELE, T. W. J.; STUCKEY, D. C. The effect of Fe<sub>2</sub>NiO<sub>4</sub> and Fe<sub>4</sub>NiO<sub>4</sub>Zn magnetic nanoparticles on anaerobic digestion activity. *Science of The Total Environment*, v. 642, p. 276-284, 2018.

CHEN, J.; ZHANG, P.; ZHANG, J.; HE, Y.; TONG Y.W. Micro–Nano Magnetite-Loaded Biochar Enhances Interspecies Electron Transfer and Viability of Functional Microorganisms in Anaerobic Digestion. *ACS Sustain. Chem & Engineer.*, v. 10, p. 2811-2821, 2022.

CHERNICHARO, C. D. Reatores Anaeróbios-Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 2a Edição, vol. 5. Belo Horizonte, Brasil: Departamento de Engenharia Sanitária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

CRUZ VIGGI, C.; ROSSETTI, S.; FAZI, S.; PAIANO, P.; MAJONE, M.; AULENTA, F. Magnetite Particles Triggering a Faster and More Robust Syntrophic Pathway of Methanogenic Propionate Degradation. *Environ. Sci. Technol.*, v. 48, p. 7536–7543, 2014.

DE SÁ, L.; CAMMAROTAC, M.; FERREIRA-LEITÃO, V. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. *Química Nova*, v. 37, n. 5, p.857-867, 2014.

DEHHAGHI, M.; MEISAM, T.; AGHBASHLO, M.; PANAH, H. K. S.; NIZAMI, A. A state-of-the-art review on the application of nanomaterials for enhancing biogas production. *Journal of Environmental Management*, v. 251, p. 109597, 2019.

ENZMANN, F.; MAYER, F.; ROTHER, M.; HOLTSMANN, D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express*, v. 8, p. 1, 2018.

GANZOURY, M. A.; ALLAM N. K. Impact of nanotechnology on biogas production: A mini-review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50, p. 1392-1404, 2015.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja - reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Quím. Nova*, v. 30, p. 65, 2007.

GRIFFITHS, R.I; WHITELEY, A.S; O'DONNELL, A.G; BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, p. 5488–5491, 2000.

GUO, J.; PENG, Y.; NI, B.-J.; HAN, X.; FAN, L.; YUAN, Z. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb. Cell Fact.*, v. 14, p. 33, 2015.

HAHNKE, S.; MAUS, I.; WIBBERG, D.; TOMAZETTO, G.; PÜHLER, A.; KLOCKE, M.; SCHLÜTER, A. Complete genome sequence of the novel Porphyromon-

adaceae bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *J. Biotechnol.*, v. 193, p. 34–36, 2015.

HE, D.; XIAO, J.; WANG, D.; LIU, X.; FU, Q.; LI, Y.; DU, M.; YANG, Q.; LIU, Y.; WANG, Q.; NI, B.J.; SONG, K.; CAI, Z.; YE, J.; YU, H. Digestion liquid based alkaline pre-treatment of waste activated sludge promotes methane production from anaerobic digestion. *Water Res.*, v.199, p. 117198, 2021.

HU, Q.; SUN, D.; MA, Y.; QIU, B.; GUO, Z. Conductive polyaniline enhanced methane production from anaerobic wastewater treatment. *Polymer*, v. 120, p. 236–243, 2017.

IM, S.; YUN, Y.M.; SONG, Y.C.; KIM, D.H. Enhanced anaerobic digestion of glycerol by promoting DIET reaction. *Biochem. Eng. J.*, v. 142, p. 18–26, 2019.

KATO, S.; HASHIMOTO, K.; WATANABE, K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.*, v. 14, p. 1646–1654, 2012a.

KATO, S.; HASHIMOTO, K.; WATANABE, K. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States. Am.*, v; 109 p. 10042, 2012b.

KHATAMI, K.; ATASOY, M.; LUDTKE, M.; BARESEL, C.; EYICE, Ö.; CETECIOGLU, Z. Bioconversion of food waste to volatile fatty acids: Impact of microbial community, pH and retention time. *Chemosphere*, v. 275, p. 129981, 2021.

KUMAR, V.; NABATEREGA, R.; KHOEI, S.; ESKICIOGLU, C. Insight into interactions between syntrophic bacteria and archaea in anaerobic digestion amended with conductive materials. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, v. 144, p. 110965, 2021.

LEI, Y.; SUN, D.; DANG, Y.; CHEN, H.; ZHAO, Z.; ZHANG, Y.; HOLMES, D.E. Stimulation of methanogenesis in anaerobic digesters treating leachate from a municipal solid waste incineration plant with carbon cloth. *Bioresour. Technol.*, v. 222, p. 270–276, 2016.

LI, H.; CHANG, J.; LIU, P.; FU, L.; DING, D.; LU, Y. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments. *Environ. Microbiol.*, v.17, p. 1533–1547, 2015.

LI, L.; LIU, H.; CHEN, Y.; YANG, D.; CAI, C.; YUAN, S.; DAI, X. Effect of Magnet-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite structure on methane production during anaerobic sludge digestion: Establishment of direct interspecies electron transfer. *Renew. Ener.*, v. 188, p. 52-60, 2022.

LI, L.; XU, Y.; DAI, X.; DAI, L. Principles and advancements in improving anaerobic digestion of organic waste via direct interspecies electron transfer. *Renew. Sustain. Ener. Rev.*, v. 148, p. 111367, 2021.

LI, Y.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; QUAN, X.; ZHAO, Z. Potentially direct interspecies electron transfer of methanogenesis for syntrophic metabolism under sulfate-reducing conditions with stainless steel. *Bioresour. Technol.*, v. 234, p. 303–309, 2017.

LIM, J.W.; PARK, T.; TONG, Y.W.; YU, Z. Chapter One - The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis. *Advances in Bioenergy*, v. 5, p. 1-61, 2020.

LIN, R.; CHENG, J.; ZHANG, J.; ZHOU, J.; CEN, K.; MURPHY, J.D. Boosting bio-methane yield and production rate with graphene: the potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.*, v. 239, p. 345–352, 2017.

LIU, F.; ROTARU, A.; SHRESTHA, P.M.; MALVANKAR, N.S.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.*, v. 5, p. 8982, 2012.

LOVLEY, D.R. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 71, p. 643–664, 2017a.

LOVLEY, D.R. Happy together: microbial communities that hook up to swap electrons. *ISME J.*, v. 11, p. 327–336, 2017b.

LUND H. *Renewable Energy Systems*. Academic Press. 2010.

MADIGAN, M. *Brock biology of microorganisms. thirteenth ed.* Upper Saddle River, 2012.

MAO C, FENG Y, WANG X, REN G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renew. Sust. Ener. Rev.*, v. 45, p. 540-555, 2015.

MARTINS, G.; SALVADOR, A.F.; PEREIRA, L.; ALVES, M.M. Methane production and conductive materials: a critical review. *Environ. Sci. Technol.*, v. 52, p. 10241, 2018.

MASSART, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetics*, v. 17, p. 1247-1248, 1981.

MCALLISTER, S., CHEN, J.Y. AND FERNANDEZ-PELLO, A.C. *Fundamentals of combustion processes*. Springer Science and Business Media. 2011.

MCCARTY, P.L.; MCKINNE, R.E. Volatile acid toxicity in anaerobic digestion. *Water Pollution Control Federation*, v. 33, p. 223–232, 1961.

MEI, R.; NOBU, M.K.; NARIHIRO, T.; YU, J.; SATHYAGAL, A.; WILLMAN, E.; LIU, W. Novel Geobacter species and diverse methanogens contribute to enhanced methane production in media-added methanogenic reactors. *Water Res.*, v. 147, p. 403–412, 2018.

MOSTAFA, A.; IM, S.; SONG, Y.-C.; KANG, S.; KIM, D.H. Enhanced Anaerobic Digestion of Long Chain Fatty Acid by Adding Magnetite and Carbon Nanotubes. *Microorganisms*, v. 8, p. 333, 2020.

NKOA, R. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agron Sustain Dev.*, v.34, p. 473–92, 2014.

NOVI, J. C.; OLIVEIRA, W. B.; SALGADO JUNIOR, A. P.; OLIVEIRA, M. M. B. Análise da gestão do glicerol: riscos e oportunidades sobre sua destinação frente à lacuna normativa e aspectos sustentáveis. *REAd. Rev. eletrôn. adm. (Porto Alegre)*, v. 24, p. 217-243, 2018.

NOVOSELOV. K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, v. 306, p. 666-669, 2004.

PAIN D.; DANCIS A. Roles of Fe–S proteins: From cofactor synthesis to iron homeostasis to protein synthesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 38, p. 45-51, 2016.

PALACIOS, P.A.; FRANCIS, W.R.; ROTARU, A. A Win–Loss Interaction on Fe<sup>0</sup> Between Methanogens and Acetogens From a Climate Lake. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021.

PARK J.H.; KANG H.J.; PARK K.H.; PARK H.D. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. *Bioresour Technol.*, v. 254, p. 300-311, 2018.

PEREIRA, W. S.; FREIRE, R. S. Ferro zero: uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. *Quím. Nova*, v. 28, p. 130–136, 2005.

POH, P. E.; TAN, D.T.; CHAN, E.; TEY, B.T. Current Advances of Biogas Production via Anaerobic Digestion of Industrial Wastewater. *Advances in Bioprocess Technology*, v. 64, p. 149–163, 2015.

POTTMAIER, D.; MELO, C.R.; SARTOR, M.N.; KUESTER, S.; AMADIO, T.M.; FERNANDES, C.A.H.; MARINHA, D.; ALARCON, O.E. The Brazilian energy matrix: From a materials science and engineering perspective. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 19, p. 678-691, 2013.

QIAO, W.; TAKAYANAGI, K.; LI, Q.; SHOFIE, M.; GAO, F.; DONG, R.; LI, Y. Thermodynamically enhancing propionic acid degradation by using sulfate as an external electron acceptor in a thermophilic anaerobic membrane reactor. *Water Res.*, v. 106, p. 320-329, 2016.

RAJAEIFAR, M.A., GHANAVATI, H., DASHTI, B.B., HEIJUNGS, R., AGHBASHLO, M., TABATABAEI, M. Electricity generation and GHG emission reduction potentials through different municipal solid waste management technologies: a comparative review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, v. 79, p. 414–439. 2017.

RAO, C.N.R.; RAO, C.V.S. Electrical Conduction in Metal Oxides. *Phys. Stat. Sol. (a)*, v. 1., p. 597, 1970.

RODRIGUES, A.C.C. Policy, regulation, development and future of biodiesel industry in Brazil. *Clean. Eng. Technol.*, v. 4, p. 100197, 2021.

RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K. ; DE OLIVEIRA, J.E.; AMÂNCIO VARESCHE, M. B.; MAINTINGUER, S. I. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. *International journal of hydrogen energy*, v. 44, p. 144-154, 2019.



RODRIGUES, C.V.; RIOS ALCARAZ, F.A.; NESPECA, M.G.; RODRIGUES, A.V.; MOTTERAN, F.; TALLARICO ADORNO, M.A.; VARESCHE, M.B.A.; MAINTINGUER, S.I. Biohydrogen production in an integrated biosystem using crude glycerol from waste coking oils. *Renew. Energy*, v. 162, p. 701–711, 2020.

ROTARU, A.; SHRESTHA, P.M.; LIU F.; SHRESTHA, M.; SHRESTHA, D.; EMBREE, M. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ Sci*, v. 7, p. 408–415, 2014.

SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, V.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 44, p. 29575-29582, 2019.

SHAH, F.A.; MAHMOOD, Q.; SHAH, M.M.; PERVEZ, A.; ASAD, S.A. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 2014.

SILES LÓPEZ, J.Á.; MARTÍN SANTOS, M.Á.; CHICA PÉREZ, A.F.; MARTÍN A.M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5609–5615, 2009.

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

SCHINK, B.; STAMS, A.J.M. Syntrophism among prokaryotes. *The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Springer, New York, 2005.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions. *Renewable Energy*, v. 161, p. 361-372, 2020.

SUMMERS, Z.M.; FOGARTY, H.E.; LEANG, C.; FRANKS, A.E.; MALVANKAR, N.S.; LOVLEY, D.R. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, v. 330, p. 1413–1415, 2010.

SUN, Y.; LI, X.; CAO, J.; ZHANG, W.; WANG, P. Characterization of zero-valent iron nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 120, p. 47-56, 2006.

SYDOW, A.; KRIEG, T.; MAYER, F.; SCHRADER, J.; HOLTSMANN, D. Electroactive bacteria – molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 98, p. 8481–8495, 2014.

TANNHAUSER, D.S. Conductivity in iron oxides. *J. Phys. Chem. Solids*, v. 23, p. 25-34, 1962.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia 10ª Edição*, Artmed, 934 p., 2012.

TRAVERSI, D.; VILLA, S.; LORENZI, E.; DEGAN, R.; GILLI, G. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *J. Environ. Manage.*, v. 111, p. 173–177, 2012.

VAN, D. P.; FUJIWARA, T.; THO, B. L.; TOAN, P. P. S.; MINH, G. H. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. *Environmental Engineering Research*, v.25, p. 1-17, 2020.

VERAS, S.T.S.; ROJAS, P.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; SANZ, J.L. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. *Bioresour. Technol.*, v. 279, p. 140–148, 2019.

VERONEZE, M. L.; SCHWANTES, D.; GONÇALVES JR, A. C.; RICHART, A.; MANFRIN, J.; SCHILLER, A. P.; SCHUBA, T. B. Production of biogas and biofertilizer using anaerobic reactors with swine manure and glycerin doses. *Journal of Cleaner Production*, v. 213, p. 176-184, 2019.

VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; PINTO, G. A.S.; SANTAELLA, S. T. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, v. 1, p. 81-92, 2012.

WALKER, D.; NEVIN, K.P.; HOLMES, D.E.; ROTARU, A.E.; WARD, J.E.; WOODARD, T.L.; ZHU, J.; UEKI, T.; NONNENMANN, S.S.; MCINERNEY, M.J.; LOVLEY, D.R. Syntrophus conductive pili demonstrate that common hydrogen-donating syntrophs can have a direct electron transfer option. *ISME J.*, v. 14, p. 837–846, 2020.

WANG, T.; ZHANG, D.; DAI, L.; CHEN, Y.; DAI, X. Effects of Metal Nanoparticles on Methane Production from Waste-Activated Sludge and Microorganism Community Shift in Anaerobic Granular Sludge. *Science Reports*, v. 6, p. 25857, 2016.

WANG, Y., WANG, D., FANG, H. Comparison of enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge through adding nano-zero valent iron and zero valent iron. *RSC Adv.* v. 8, p. 27181–27190, 2018.

WANG, Z.; WANG, T.; SI, B.; WATSON, J.; ZHANG, Y. Accelerating anaerobic digestion for methane production: Potential role of direct interspecies electron transfer. *Renew. Sust. Energy Rev.*, v. 145, p. 111069, 2021.

WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 201–223, 2001.

YANG, P.; TAN, G.A.; ASLAM, M.; KIM, J.; LEE, P. Metatranscriptomic evidence for classical and RuBisCO-mediated CO<sub>2</sub> reduction to methane facilitated by direct interspecies electron transfer in a methanogenic system. *Sci Rep-Uk*, v. 9, 2019.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 18, p. 213–219, 2007.

YIN, Q; WU, G. Advances in direct interspecies electron transfer and conductive materials: electron flux, organic degradation and microbial interaction. *Biotechnol. Adv.*, v. 37, p. 107443, 2019.

YORO, K.O., DARAMOLA, M.O., SEKOAI, P.T., WILSON, U.N., ETERIGHO-IKELEGBE, O. Update on current approaches, challenges, and prospects of modeling and simulation in renewable and sustainable energy systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 150, p. 111506, 2021.

YU, H.; SONG, Y.; BAE, B.; LI, J.; JANG, S. Electrostatic Fields Promote Methanogenesis More than Polarized Bioelectrodes in Anaerobic Reactors with Conductive Materials. *ACS Omega*, v. 6, p. 29703-29712, 2021.

ZHAO, Z.; ZHANG, Y. Application of ethanol-type fermentation in establishment of direct interspecies electron transfer: A practical engineering case study. *Renew. Energy*, v. 136, p. 846-855, 2019.

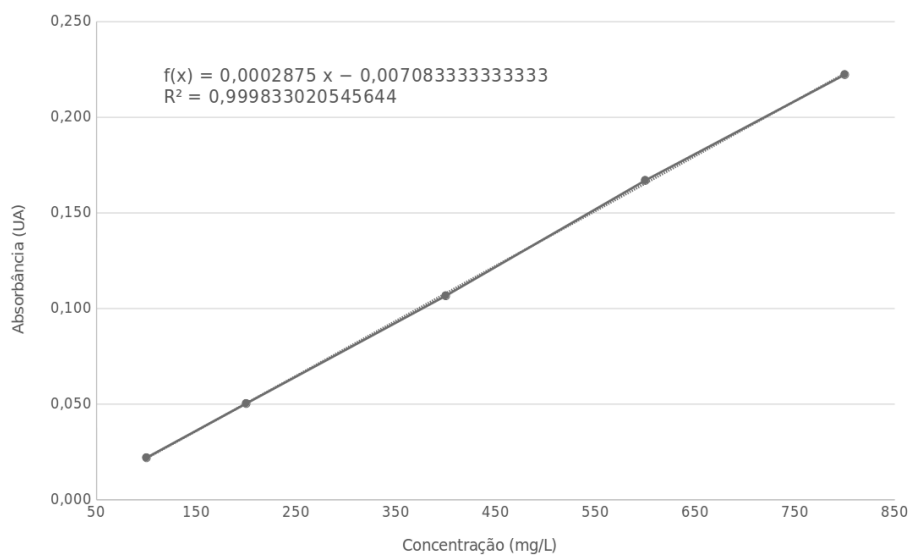
ZHENG, S.; LIU, F.; WANG, B.; ZHANG, Y.; LOVLEY, D.R. Methanobacterium Capable of Direct Interspecies Electron Transfer. *Environ. Sci. & Tech.*, v. 54, p. 15347-15354, 2020.

ZIEMIŃSKI, K.; FRĄC, M. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 4127–4139, 2012.

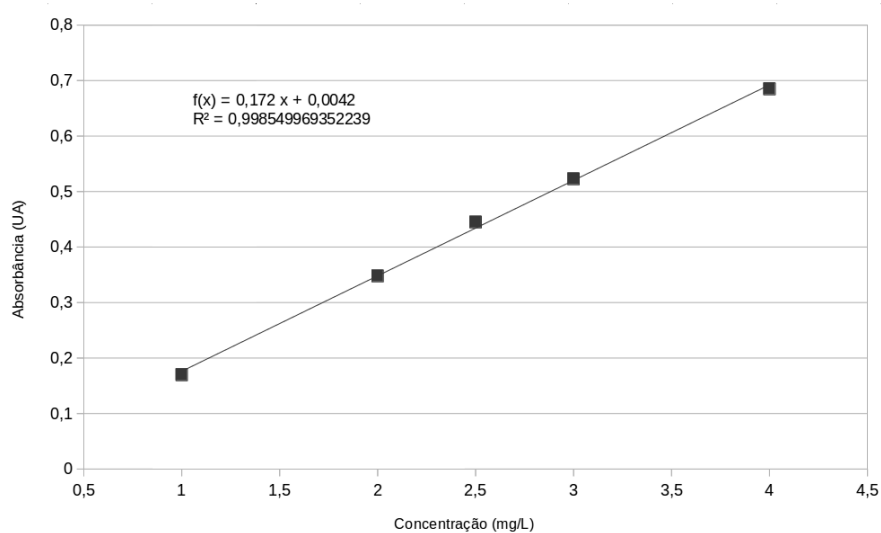
ZHOU, L.; YAN, X.; PEI, X.; DU, J.; MA, R.; QIAN, J. The role of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle in the anaerobic digestion (AD) of waste activated sludge (WAS). *Chinese Chemical Letters*, v. 33, p. 428–433, 2022.

## ANEXOS

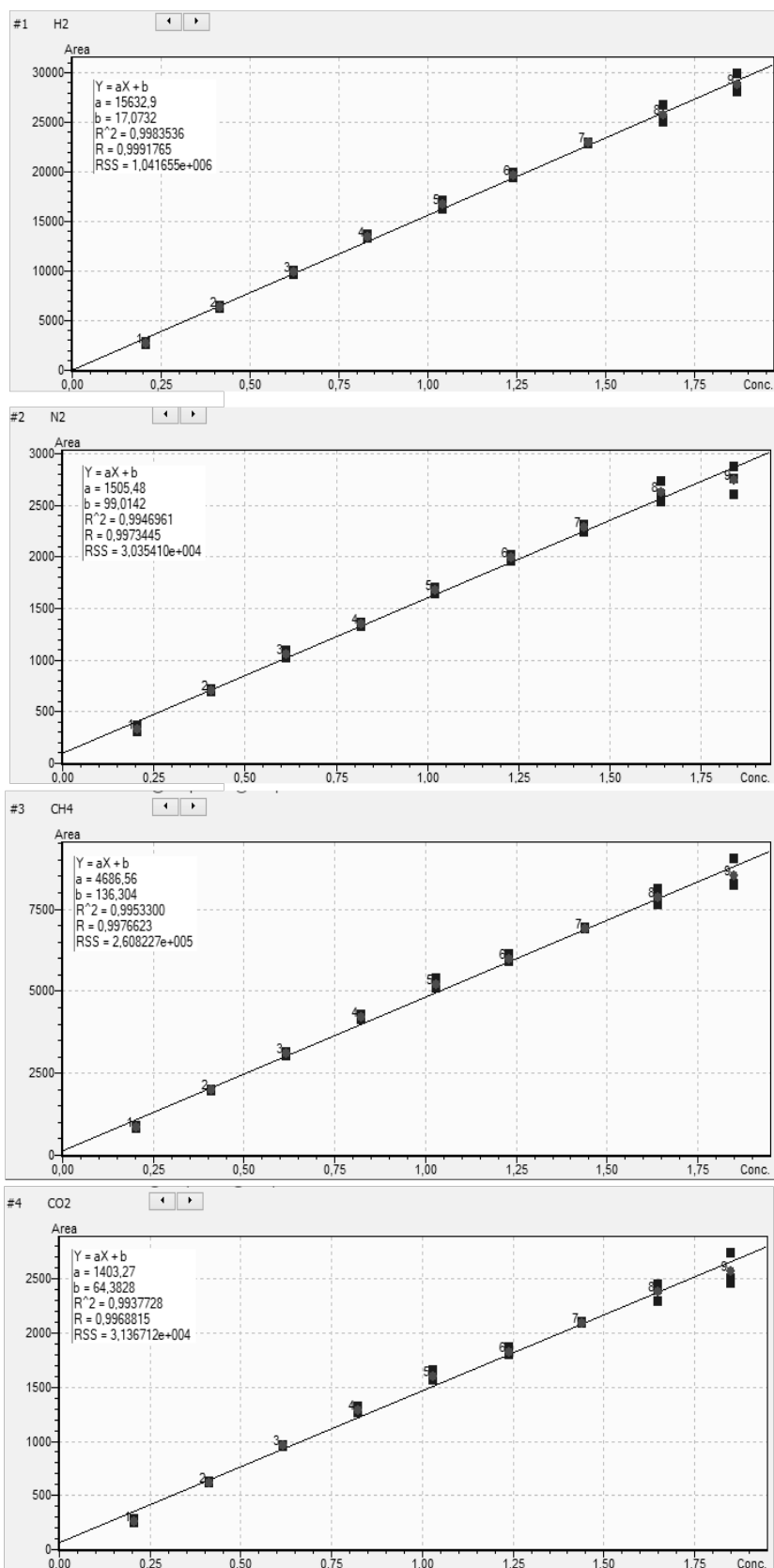
**Anexo 1:** Curva de calibração utilizada para determinação de demanda química de oxigênio (DQO), obtida para o comprimento de onda de 620 nm.



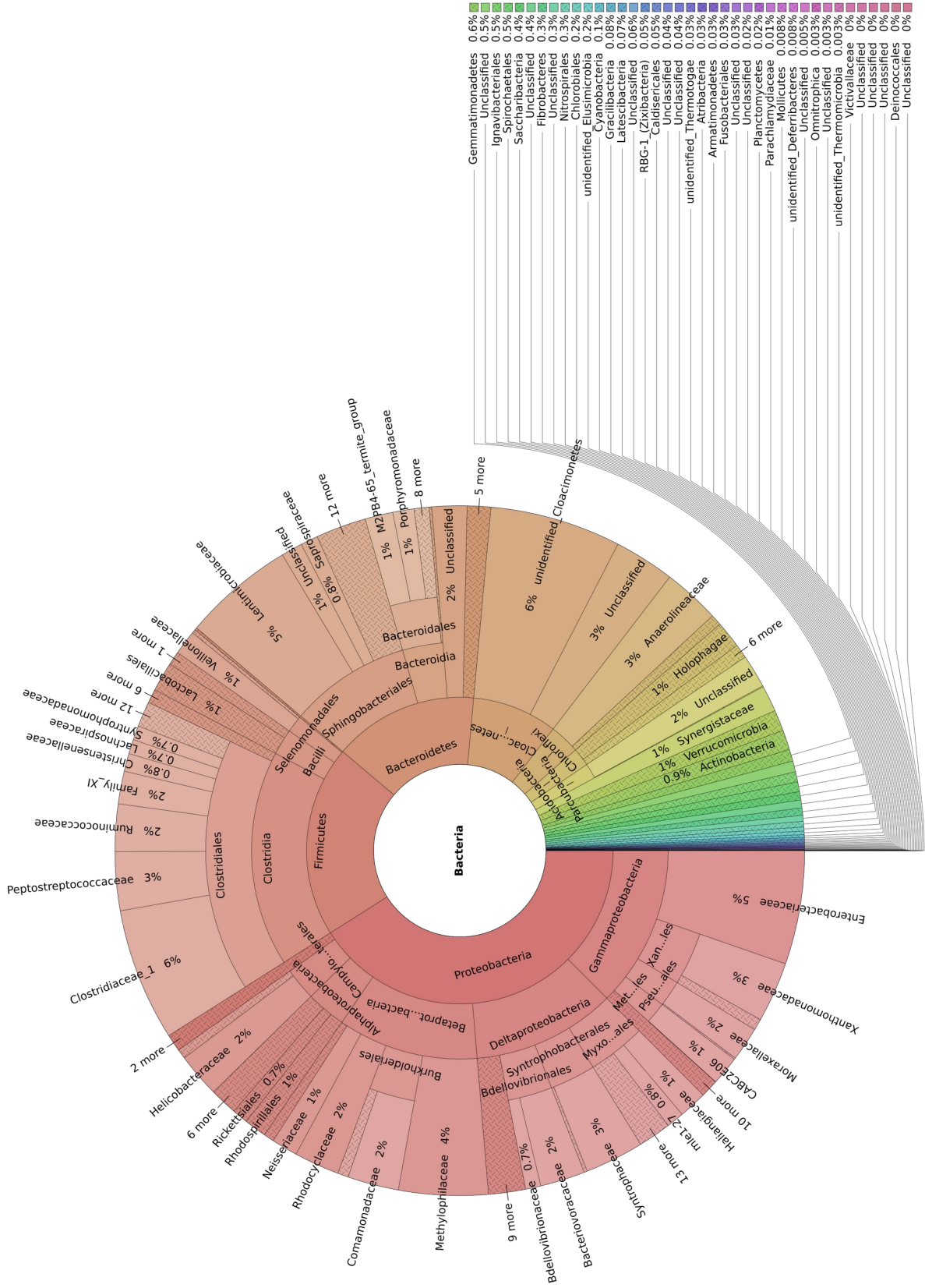
**Anexo 2:** Curva de calibração para o método da 1,10-fenantrolina, utilizada para determinação de ferro total em solução aquosa, obtida para comprimento de onda de 510 nm.



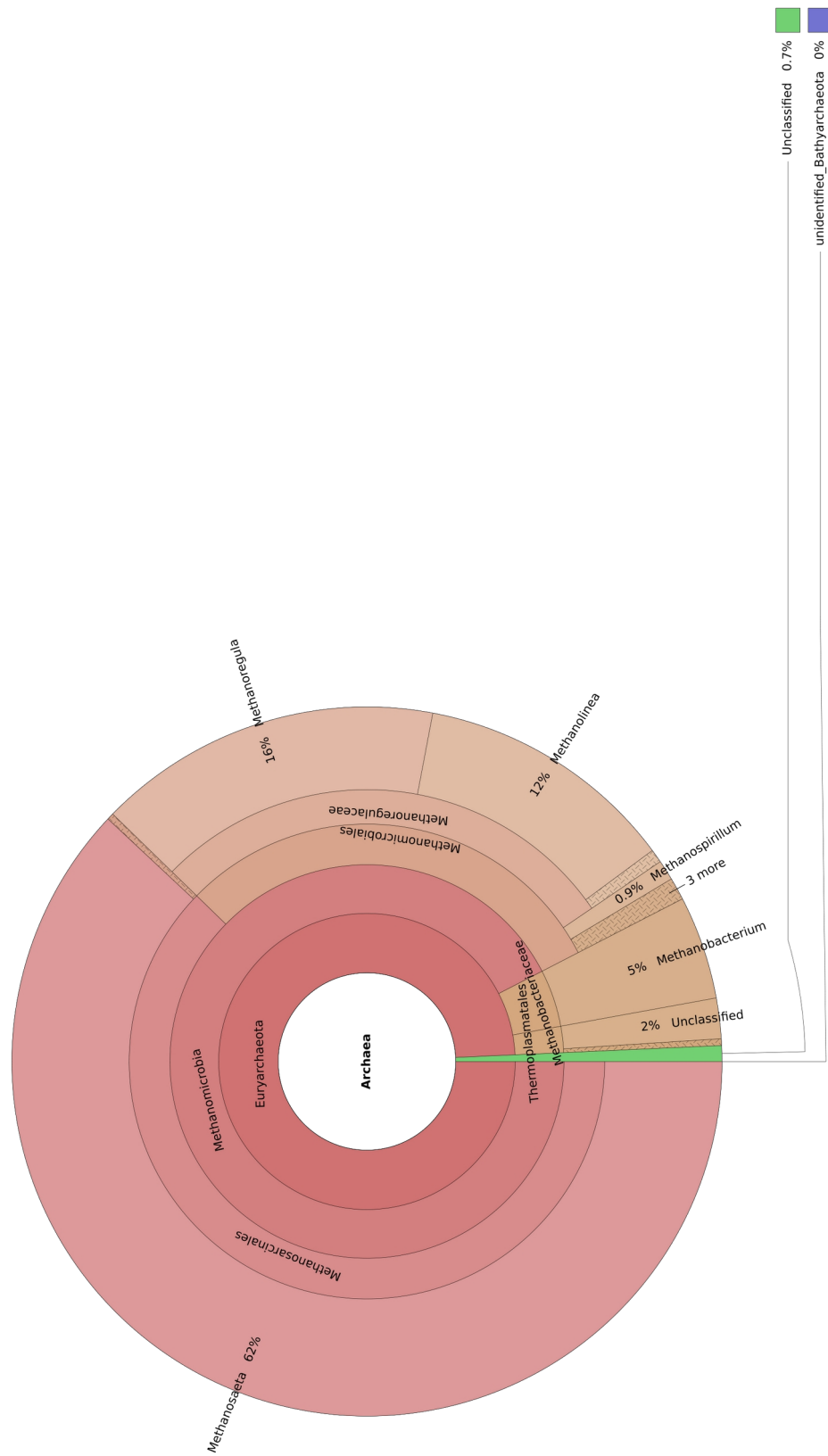
**Anexo 3:** Curvas de calibração para cromatografia gasosa, utilizadas para determinação de H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.



Anexo 4: Gráfico Krona referente às bactérias (e seus respectivos filos, classes, ordens e famílias) encontradas na amostra de inóculo.

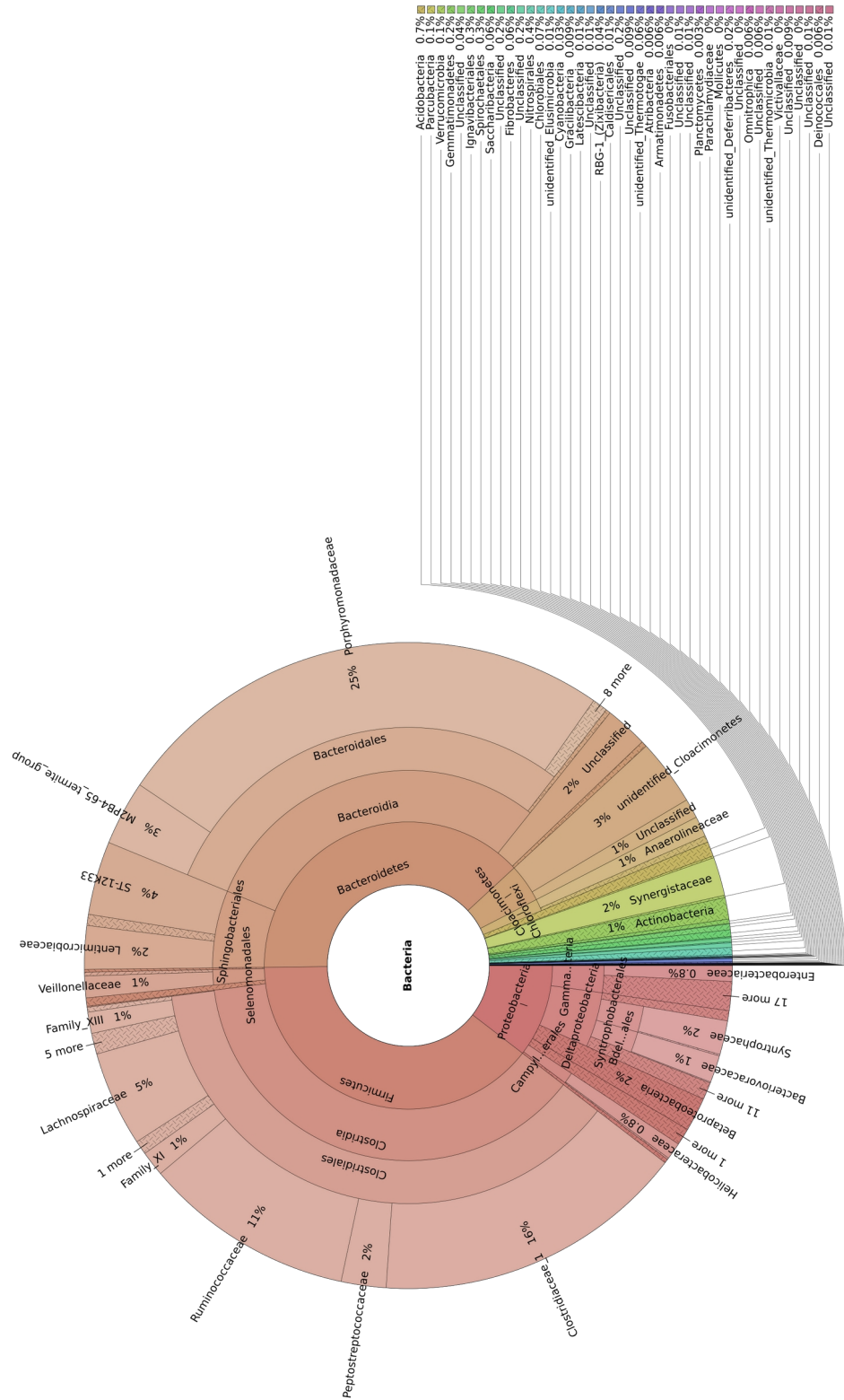


**Anexo 5:** Gráfico Krona referente às arqueais (e seus respectivos filos, classes, ordens, famílias e gêneros) encontradas na amostra de inóculo.





**Anexo 6:** Gráfico Krona referente às bactérias (e seus respectivos filos, classes, ordens e famílias) encontradas na amostra reator alimentado com glicerol bruto e suplementado com 0,2 g L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, após 170 h de operação.



**Anexo 7:** Gráfico Krona referente às arqueais (e seus respectivos filos, classes, ordens, famílias e gêneros) encontradas na amostra reator alimentado com glicerol bruto e suplementado com 0,2 g L<sup>-1</sup> de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, após 170 h de operação.

