

CAROLINE VARELLA RODRIGUES

Codigestão anaeróbia do glicerol bruto em resíduos orgânicos agroindustriais
visando à geração de biogás

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Química

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer
Coorientadora: Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires

Araraquara
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

R696c Rodrigues, Caroline Varella
Codigestão anaeróbia do glicerol bruto em resíduos orgânicos agroindustriais visando à geração de biogás / Caroline Varella Rodrigues. – Araraquara : [s.n.], 2021
186 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Sandra Imaculada Maintinguer
Coorientador: Lorena Oliveira Pires

1. Fermentação. 2. Glicerina. 3. Biorreatores.
4. Hidrogênio. 5. Metano. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

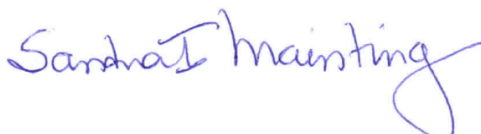
TÍTULO DA TESE: Codigestão anaeróbia do glicerol bruto em resíduos orgânicos agroindustriais visando à geração de biogás

AUTORA: CAROLINE VARELLA RODRIGUES

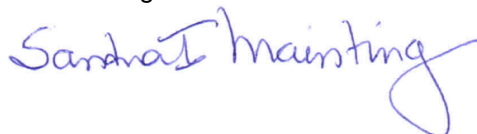
ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

COORIENTADORA: LORENA OLIVEIRA PIRES

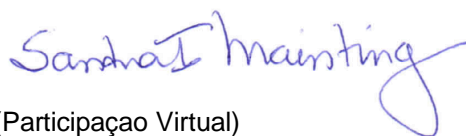
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



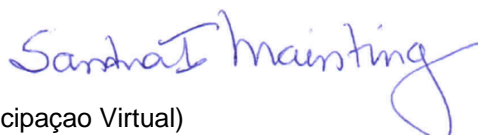
Pesquisadora SANDRA IMACULADA MAINTINGUER (Participação Virtual)
IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro



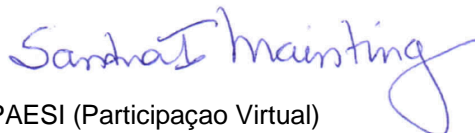
Profa. Dra. MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia - USP - São Carlos



Prof. Dr. RODRIGO SEQUINEL (Participação Virtual)
Departamento de Engenharias e Exatas / Universidade Federal do Paraná - UFPR - Palotina



Prof. Dr. ROGERS RIBEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Alimentos / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP - Pirassununga/SP



Profa. Dra. SUELEN OSMARINA PAESI (Participação Virtual)
Laboratório de Diagnóstico Molecular / Instituto de Biotecnologia - UCS - Caxias do Sul

Araraquara, 24 de maio de 2021

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Caroline Varella Rodrigues

Nome em citações bibliográficas: RODRIGUES, C. V.; Caroline Varella Rodrigues; C. V. Rodrigues; RODRIGUES, CAROLINE VARELLA, VARELLA RODRIGUES, CAROLINE.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto de Química – Câmpus de Araraquara. Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Quitandinha – Araraquara/SP – CEP 14800-060.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

▪ 2014 – 2016

Mestrado em Química.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Araraquara/SP – Brasil.

Título: Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproducto da produção do biodiesel.

Ano de Obtenção: 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer.

Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Palavras-chave: Bioprodução de hidrogênio; Consórcio microbiano; *Enterobacter* sp; Fermentação; Glicerol bruto; Óleo de cozinha usado.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra

▪ 2009 – 2014

Graduação em Química Tecnológica.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Araraquara/SP – Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- **2021**

Curso: “Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos”.

Carga horária: 30h.

PROTIMIZA, Assessoria e Treinamento em Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, CNPJ: 10.963.132/0001-72. Brasil.

- **2018**

Curso: “Molecular biology tools to understand the microbial processes involved in the production of bioenergy using wastes and wastewaters”.

Carga horária: 24h.

Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPEN) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Rio Claro/SP - Brasil.

- **2018**

Curso: “Mendeley como ferramenta gerenciadora de referências no auxílio à escrita acadêmica”.

Carga horária: 4h.

Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPEN) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Rio Claro/SP - Brasil.

- **2018**

1ª Escola de Verão em Química.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

- **2017**

Curso: “Métodos em caracterização química de biomassa”.

Carga horária: 24h.

Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPEN) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Rio Claro/SP - Brasil.

- **2017**

Treinamento das Bases de Dados Clarivate Analytics.

Carga horária: 3h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

▪ **2015**

Treinamento de Primeiros Socorros.

Carga horária: 4h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

▪ **2013**

Conceito Teórico e Prático de Viscosimetria com Software Wingather.

Carga horária: 4h.

Rhodia “Solvay Group” - Filial Paulínia/SP - Brasil.

▪ **2012**

Computação Excel Avançado.

Carga horária: 8h.

Up to You Informática, UTY, Araraquara-SP - Brasil.

▪ **2011**

Curso: “Programa 5's - Conceitos e Aplicações”.

Carga horária: 1h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

▪ **2011**

Curso: “A Química dos Materiais: indústria, tendências e aplicabilidades”.

Carga horária: 12h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

▪ **2010**

Curso: “Métodos analíticos e sensores químicos para os diagnósticos de doenças”.

Carga horária: 20h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

▪ **2009**

Curso: “Cosmetologia em ênfase em protetores solares e tratamento capilar”.

Carga horária: 20h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

▪ **2009**

Curso: “Das crônicas às animações em 3D”.

Carga horária: 6h.

Instituto de Química (IQ) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Araraquara/SP - Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

▪ **2017 - 2021**

Vínculo: Bolsista CNPq.

Carga horária: 40h semanais.

Outras informações: Doutorado em Química – Instituto de Química (IQ) – Unesp – Araraquara/SP e Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) – Unesp – Rio Claro/SP.

Projeto: Codigestão anaeróbia do glicerol bruto em resíduos orgânicos agroindustriais visando à geração de biogás.

▪ **2014 - 2016**

Vínculo: Bolsista CAPES.

Carga horária: 40h semanais.

Outras informações: Mestrado em Química – Instituto de Química (IQ) – Unesp – Araraquara/SP.

Projeto: Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel.

▪ **2013 - 2014**

Vínculo: Estagiária em Pesquisa e Desenvolvimento na multinacional “Rhodia – Solvay Group”.

Carga horária: 30h semanais.

Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações: atuação na área de Pesquisa e Desenvolvimento no Laboratório de Solventes da Rhodia.

▪ **2011 - 2012**

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica FAPESP.

Carga horária: 12h semanais.

Outras informações: desenvolvimento da pesquisa "Estudo Químico e Biológico em *Piper Arboreum* Aublet (Piperaceae)", atuando no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais

▪ **2010 – 2011**

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica BAAE I.

Carga horária: 12h semanais.

Outras informações: desenvolvimento da pesquisa "Estudo Fitoquímico e Biológico em Folhas de *Piper aduncum* L (Piperaceae)", atuando no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais

▪ **2009 - 2010**

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica BAAE I.

Carga horária: 12h semanais.

Outras informações: auxílio na preparação das aulas de Bioquímica do Instituto de Química (IQ) - Unesp – Araraquara/SP, atuando no Laboratório Didático de Bioquímica.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados

RODRIGUES, C.V.; ADAMES, L.V.; MARQUES, R.F.C.; JACOBUS, A.P.; PIRES, L.O.; MAINTINGUER, S.I. Biosistemas integrados na codigestão do glicerol bruto em resíduos agroindustriais para a geração de H₂ e CH₄. **Revista Matéria**, v. 26, n. 2, 2021. ISSN 1517-7076. DOI 10.1590/S1517-707620210002.1262.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; RODRIGUES, A. V.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 11943-11953, 2020.

RODRIGUES, C.V.; ALCARAZ, F. A. R.; NESPECA, M. G.; RODRIGUES, A. V.; MOTTERAN, F.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER, S. I. Biohydrogen production in an integrated biosystem using crude glycerol from waste cooking oils. **Renewable Energy**, v. 161, p. 701-711, 2020.

MATOS, J. C. S.; ROZENSKÝ, L.; VRBA, Z.; HANSEN, J. M.; HAJEK, M.; LIPA, J.; **RODRIGUES, C. V.**; LUZ, F. G. F.; CASTRO, M. C. A. A.; MAINTINGUER, S. I. Application of Electromagnetic Field in Anaerobic Biodigestion in Batch Reactors. **BioResources**, v. 15, p. 4972-4981, 2020.

RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K.; DE OLIVEIRA, J. E.; VARESCHE, M. B. A.; 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.

PACHIEGA, R.; RODRIGUES, M. F.; **RODRIGUES, C. V.**; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 155-163, 2019.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; CASTELBLANCO, M. N.; MAINTINGUER, S. I. Culturas mistas de bactérias anaeróbias geradoras de H₂ aplicadas no consumo de glicerol bruto gerado em usinas de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos. **Revista Brasileira de Energia Renováveis**, v. 6, p. 128-135, 2017.

NESPECA, M. G.; **RODRIGUES, C. V.**; SANTANA, K. O.; MAINTINGUER, S. I.; DE OLIVEIRA, J. E. Determination of alcohols and volatile organic acids in anaerobic bioreactors for H₂ production by near infrared spectroscopy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 20480-20493, 2017.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Aplicação de Glicerol Bruto Pré-Tratado em Processos Biológicos de Geração de H₂. **Revista Ciência & Tecnologia**: FATEC-JB, v. 8, p. 1-16, 2016.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de gás hidrogênio a partir de glicerol bruto e esgoto sanitário. **Revista Ciência & Tecnologia**: FATEC-JB, v. 8, p. 1-14, 2016.

TORQUATO, L. D. M.; PACHIEGA, R.; **RODRIGUES, C. V.**; CRESPI, M. S.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de hidrogênio a partir de lodos de diferentes sistemas de tratamento de esgotos. **Revista Ciência & Tecnologia**: FATEC-JB, v. 8, p. 1-14, 2016.

RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 14641-14651, 2016.

Artigos submetidos

RODRIGUES, C. V.; DA SILVA, D. C., MARQUES, A. C. A.; PACHIEGA, R.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Butanol production with pure and mixed cultures from agroindustrial wastes. **Biomass and Bioenergy**.

Submetido: 22/02/2021.

TORQUATO, L. D. M.; SILVA, L. M.; COSTA E SILVA, B.; **RODRIGUES, C. V.**; DA SILVA, D. C.; MAINTINGUER, S. I.; ZANONI, M. V. B. The role of surface properties of bagasse biochars in electronshuttling through an anaerobic citrus consortium applied to the conversion of glycerol into high added-value bioproducts. **Applied Energy**.

Submetido: 30/01/2021.

Capítulos de livros publicados

RODRIGUES, C. V.; RODRIGUES, A. V.; ANTONIOSI, L.; MAINTINGUER, S. I. Applications of Biodiesel and Crude Glycerol: The Products Generated by Transesterification Process. TRANSESTERIFICATION PROCESS, MECHANISM AND APPLICATIONS. 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2019, p. 83-122. ISBN: 978-1-53614-545-8.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; PIRES, L. O.; BRIENZO, M.; MAINTINGUER, S. I. Biohydrogen Generation: Concepts and Applications on Brazilian Agro-Industrial Wastewaters. BIOHYDROGEN: PRODUCTION, APPLICATIONS AND TECHNOLOGY. 1ed.: Nova Science Publishers, 2017, p. 1-68. ISBN: 978-1-53612-483-5.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

NESPECA, M. G.; **RODRIGUES, C. V.**; SANTANA, K. O.; DE OLIVEIRA, J. E. Determinação de metanol em biorreatores anaeróbios por NIRS-SVM. In: VIII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2017, Rio Claro. ANAIS DO VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA. Rio Claro: Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente, 2017. v. 6. p. 319-324.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Caracterização de glicerol bruto gerado a partir de óleo reciclado para geração de 1,3-propanodiol. In: 1º Congresso de Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), 2016, Matão. 1º Congresso de Pós-Graduação, 2016.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Geração de biohidrogênio a partir de glicerol bruto utilizando consórcios de bactérias anaeróbias fermentativas e cultura pura *Enterobacter* sp. In: 1º Congresso de Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), 2016, Matão. 1º Congresso de Pós-Graduação, 2016.

Apresentação de trabalho e/ou palestra

Pôster / Workshop

“I Workshop do Projeto Temático FAPESP – Fruto-refinaria: processos de obtenção, métodos de caracterização e geração de produtos oriundos de resíduos da fruticultura”

Local: On-line.

Período: 28 de abril de 2021.

RODRIGUES, C.V.; PACHIEGA, R., ALMEIDA, S.; CRESPI, M.S.; MAINTINGUER, S.I.

Reatores anaeróbios alimentados com vinhaça citrícola: caracterização térmica e obtenção de biocombustíveis por digestão anaeróbia.

RODRIGUES, C.V.; PIRES, L.O.; MAINTINGUER, S.I. Geração de ácido lático e biometano a partir da co-digestão da vinhaça citrícola e glicerol bruto.

Aula – IPBEN - Unesp

Local: On-line.

Período: 2 de dezembro de 2020 / duração de 3 horas.

Aula teórica ministrada “Application of Biologic Processes – Case study of Crude Glycerol”, na disciplina BIOLOGIC PROCESSES APPLIED IN BIOENERGY do Núcleo “Tópicos Avançados em Biorrefinarias” do Programa Integrado de Pós-Graduação em Bioenergia (USP UNESP UNICAMP) no Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) - Unesp – Rio Claro/SP.

Pôster / Congresso

“Latin American Meetings on Anaerobic Digestion (Uruguay Session)”

Local: On-line.

Período: 22 de outubro de 2020.

RODRIGUES, C. V.; DUSSÁN, K. J. M.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Co-digestion of crude glycerol and citrus vinasse to H₂, propionic acid and CH₄ production.

Pôster / Congresso

“III Workshop de Bioenergia, P&D na Unesp/IPBEN”

Local: Laboratório Central (IPBEN) – Unesp - Rio Claro/SP.

Período: 28 de novembro de 2019.

RODRIGUES, C. V. Produção de 1,3-propanodiol e biometano a partir de resíduos da fabricação do biodiesel.

Pôster / Congresso

“VII Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel”

Local: Florianópolis/SC.

Período: 04 a 07 de novembro de 2019.

RODRIGUES, C. V.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Re-aproveitamento biotecnológico do glicerol proveniente da produção de biodiesel na geração de biometano e 1,3-propanodiol.

Pôster / Congresso

“1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio”

Local: Rio de Janeiro – RJ.

Período: 07 e 08 de novembro de 2019.

RODRIGUES, C. V.; ADAMES, L. V.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Biosistemas Integrados na Codigestão do Glicerol Bruto em Resíduos Agroindustriais para geração de H₂ e CH₄.

Pôster / Congresso

“IWC - 16th World Conference on Anaerobic Digestion”

Local: Delft, Holanda.

Período: 23-27 de junho de 2019.

RODRIGUES, C. V. 1,3-Propanediol and methane production by co-digestion of crude glycerol in an integrated biosystem.

Pôster / Congresso

“XI Fórum de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente – Desafios do Saneamento Ambiental”

Local: Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara/SP.

Período: 7 de junho de 2019.

RODRIGUES, C. V.; OLIVEIRA, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Aproveitamento biotecnológico do glicerol proveniente da produção de biodiesel na geração de biometano e 1,3-propanodiol.

Pôster / Congresso

“II Workshop de Bioenergia, P&D na Unesp/IPBEN”

Local: Laboratório Central (IPBEN) – Unesp - Rio Claro/SP.

Período: 17 de dezembro de 2018.

RODRIGUES, C. V.; ALCARAZ, F. A. R.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER, S. I. Application of integrated biosystems using crude glycerol for biohydrogen generation.

Pôster / Congresso

“XIII Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia”

Local: Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín - Colombia

Período: 21, 22, 23 e 24 de outubro de 2018.

RODRIGUES, C. V.; ALCARAZ, F. A. R.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER, S. I. Integrated Biosystems using Crude Glycerol for H₂ generation.

Pôster / Congresso

“XIII Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia”

Local: Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín - Colombia

Período: 21, 22, 23 e 24 de outubro de 2018.

PACHIEGA, R.; **RODRIGUES, C. V.**; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER, S. I. Pretreatments on a subtropical granulated sludge applied on biohydrogen production using citric wastewater.

Pôster / Congresso

“XIII Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia”

Local: Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín - Colombia

Período: 21, 22, 23 e 24 de outubro de 2018.

BOSCARO, M. E.; PACHIEGA, R.; **RODRIGUES, C. V.**; BLASIUS, J. P.; MAINTINGUER, S. I. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on methane production from anaerobic digestion of glycerol.

Aula – IPBEN - Unesp

Local: On-line.

Período: 3 de outubro de 2018 / duração de 3 horas.

Ministração da aula teórica intitulada “Reusing Wastes - Case Study of Crude Glycerol”, na disciplina BIOLOGIC PROCESSES APPLIED IN BIOENERGY do Núcleo “Tópicos Avançados em Biorrefinarias” do Programa Integrado de Pós-Graduação em Bioenergia (USP UNESP UNICAMP) no Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN – Rio Claro/SP.

Pôster / Congresso

“VIII Simpósio de Microbiologia Aplicada”

Local: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Câmpus Rio Claro/SP.

Período: 17, 18 e 19 de maio de 2017.

NESPECA, M. G.; **RODRIGUES, C. V.**; SANATA, K. O.; DE OLIVEIRA, J. E.
Determinação de metanol em biorreatores anaeróbios por NIRS-SVM.

Pôster / Congresso

“V Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – V SIGERA”

Local: Foz do Iguaçu/PR

Período: 09 a 11 de maio de 2017.

RODRIGUES, C. V.; ALCARAZ, F.A.R.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; MAINTINGUER, S. I. Biosistema integrado aplicado na produção de bio-H₂ a partir de resíduos agroindustriais.

Pôster / Congresso

“V Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – V SIGERA”

Local: Foz do Iguaçu/PR

Período: 09 a 11 de maio de 2017.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; NESPECA, M. G.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Esgoto sanitário aplicado na codigestão de resíduo da indústria de biodiesel para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.

Pôster / Congresso

“1º Congresso de Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)”

Local: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), Câmpus Matão/SP.

Período: 30 de novembro a 02 de dezembro de 2016.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Geração de biohidrogênio a partir de glicerol bruto utilizando consórcios de bactérias anaeróbias fermentativas e cultura pura *Enterobacter* sp.

Pôster / Congresso

“1º Congresso de Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)”

Local: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), Câmpus Matão/SP.

Período: 30 de novembro a 02 de dezembro de 2016.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Caracterização de glicerol bruto gerado a partir de óleo reciclado para geração de 1,3-propanodiol.

Pôster / Congresso

“1º Congresso de Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)”

Local: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), Câmpus Matão/SP.

Período: 30 de novembro a 02 de dezembro de 2016.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; CASTELBLANCO, M. N.; MAINTINGUER, S. I. Culturas mistas de bactérias anaeróbias geradoras de H₂ aplicadas no consumo de glicerol bruto gerado em usinas de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos.

Pôster / Congresso

“XII Taller y Simposio Latino Americano em Digestión Anaerobia”

Local: Cusco, Peru.

Período: 23 a 27 de outubro de 2016.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I. Potential biohydrogen production with crude glycerol by mixed cultures and *Enterobacter* sp.

Pôster / Congresso

“XII Taller y Simposio Latino Americano em Digestión Anaerobia”

Local: Cusco, Peru.

Período: 23 a 27 de outubro de 2016.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Biological hydrogen production from raw glycerol and wastewater.

Aula – IPBEN - Unesp

Local: On-line.

Período: 19 de outubro de 2016 / duração de 3 horas.

Ministração da aula teórica intitulada “Reusing Wastes - Case Study of Crude Glycerol”, na disciplina BIOLOGIC PROCESSES APPLIED IN BIOENERGY do Núcleo “Tópicos Avançados em Biorrefinarias” do Programa Integrado de Pós-Graduação em Bioenergia (USP UNESP UNICAMP) no Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN – Rio Claro/SP.

Oral / Congresso

“I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental - CBMAA”

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal/SP.

Período: 12 de maio de 2016.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Aplicação de Glicerol Bruto pré-tratado em Processos Biológicos de Geração de H₂.

Pôster / Congresso

“I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental - CBMAA”

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal/SP.

Período: 12 de maio de 2016.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de gás hidrogênio a partir de glicerol bruto e esgoto sanitário.

Pôster / Congresso

“I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental - CBMAA”

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal/SP.

Período: 12 de maio de 2016.

TORQUATO, L. D. M.; PACHIEGA, R.; **RODRIGUES, C. V.**; CRESPI, M. S.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de hidrogênio a partir de lodos de diferentes sistemas de tratamento de esgotos.

Pôster / Congresso

“14th World Congress on Anaerobic Digestion”

Local: Viña del Mar, Chile.

Período: 15 a 18 de novembro de 2015.

RODRIGUES, C. V.; PINESE, M.; PACHIEGA, R.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Crude glycerol - characterization and potentialities on hydrogen bioproduction.

Pôster / Congresso

“14th World Congress on Anaerobic Digestion”

Local: Viña del Mar, Chile.

Período: 15 a 18 de novembro de 2015.

TORQUATO, L. D. M.; PACHIEGA, R.; **RODRIGUES, C. V.**; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Hydrogen bio-production using vinasse from citrus industry as substrate.

Pôster / Congresso

“1^o Encontro de Química Biotecnológica e Agroindustrial”

Local: USP, Ribeirão Preto/SP.

Período: 08 a 11 de setembro de 2015.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; PINESE, M.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Geração de H₂ por meio de consórcios bacterianos utilizando glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel.

Pôster / Congresso

“1^o Encontro de Química Biotecnológica e Agroindustrial”

Local: USP, Ribeirão Preto/SP.

Período: 08 a 11 de setembro de 2015.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; PINESE, M.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Produção de bio-H₂ a partir de glicerol bruto da produção de biodiesel com óleos residuais.

Pôster / Congresso

“1^o Workshop de Bioenergia do Laboratório Associado do IPBEN/UNESP – Câmpus Araraquara”

Local: Instituto de Química (IQ) – Unesp, Araraquara/SP.

Período: 18 de setembro de 2015.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; PINESE, M.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Geração de Bio-H₂ por meio de consórcios bacterianos utilizando glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel.

Pôster / Congresso

“I Workshop de Bioenergia do Laboratório Associado do IPBEN/UNESP – Câmpus Araraquara”

Local: Instituto de Química (IQ) – Unesp, Araraquara/SP.

Período: 18 de setembro de 2015.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; PINESE, M.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Produção de Bio-H₂ a partir de glicerol bruto da produção de biodiesel com óleos residuais.

Apresentação / Conferência

“Falling Walls Lab São Paulo - 2013”

Local: Mackenzie, São Paulo/SP.

Período: 9 de setembro de 2013.

RODRIGUES, C. V. Solventes verdes: alimento para as indústrias, reciclagem para o planeta.

Apresentação / Conferência

“Falling Walls Lab Berlin - 2013”

Local: Berlim, Alemanha.

Período: 8 de novembro de 2013.

RODRIGUES, C. V. Breaking the Wall of the Reuse of Waste.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

“Latin American Meetings on Anaerobic Digestion (Four Sessions)”

Local: On-line

Período: 22 e 29 de outubro, 5 e 12 de novembro de 2020.

“III Workshop de Bioenergia, P&D na Unesp/IPBEN”

Local: Programa Integrado de Pós-graduação em Bioenergia (Usp, Unicamp e Unesp), Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) - Unesp, Laboratório Central - Rio Claro/SP.

Período: 28 de novembro de 2019 (9 horas).

“IWC - 16th World Conference on Anaerobic Digestion”

Local: Universidade de Delft – Holanda.

Período: 23-27 de junho de 2019.

“XI Fórum de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente – Desafios do Saneamento Ambiental”

Local: Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara/SP.

Período: 7 de junho de 2019.

“II Workshop de Bioenergia, P&D na Unesp/IPBEN”

Local: Programa Integrado de Pós-graduação em Bioenergia (Usp, Unicamp e Unesp), Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) - Unesp, Laboratório Central - Rio Claro/SP.

Período: 17 de dezembro de 2018 (8 horas).

“XIII Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia”

Local: Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín - Colombia

Período: 21, 22, 23 e 24 de outubro de 2018.

“1ª Escola de Verão em Química”

Local: Instituto de Química (IQ) - Unesp, Araraquara/SP,

Período: 26 de fevereiro à 02 de março de 2018.

“1ª Escola de Verão em Química”

Participação como colaboradora do minicurso “Aplicações biotecnológicas do glicerol bruto de usinas de biodiesel por processos biológicos”

Local: Instituto de Química (IQ) - Unesp, Araraquara/SP,

Período: 26 de fevereiro à 02 de março de 2018.

“1º Congresso de Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)”

Local: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), Câmpus Matão/SP.

Período: 30 de novembro a 02 de dezembro de 2016.

“I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental - CBMAA”

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Câmpus de Jaboticabal/SP.

Período: 10 a 12 de maio de 2016 (27 horas).

“1º Encontro de Química Biotecnológica e Agroindustrial”

Local: USP, Ribeirão Preto/SP.

Período: 08 a 11 de setembro de 2015.

“Falling Walls Lab São Paulo - 2013”

Local: Mackenzie, São Paulo/SP.

Período: 9 de setembro de 2013.

“Falling Walls Lab Berlin - 2013”

Local: Berlim, Alemanha.

Período: 8 de novembro de 2013.

PRÊMIOS

Menção Honrosa na categoria “Qualidade Acadêmica”

“XI Fórum de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente – Desafios do Saneamento Ambiental”

Local: Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara/SP.

Período: 7 de junho de 2019.

Melhor trabalho da sessão oral da área de Microbiologia Aplicada

“I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental - CBMAA”

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Câmpus de Jaboticabal/SP.

Período: 10 a 12 de maio de 2016 (27 horas).

Semi-finalista do Programa de Jovem Inovador do Brasil no ano de 2013 - "Falling Walls Lab 2013 São Paulo"

“Falling Walls Lab São Paulo - 2013”

Local: Mackenzie, São Paulo/SP.

Período: 9 de setembro de 2013.

Jovem Inovadora do ano de 2013, representando o Brasil no "Falling Walls Young Innovator of the Year 2013"

"Falling Walls Lab Berlin - 2013"

Local: Berlim, Alemanha.

Período: 8 de novembro de 2013.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por sempre me encaminhar e guiar os meus caminhos, me proporcionando forças, entendimento e livramentos.
Dedico aos meus pais Marisa e Carlos, à minha irmã Aline, ao meu eterno namorado Marcelo e à minha avó Lydia (*in memoriam*), que sempre me apoiaram e acreditaram eu fosse capaz de vencer os desafios da vida.
Com carinho e gratidão.

Agradecimentos

A Deus pela vida, por me envolver em seus braços, por ser o meu caminho de verdade, pela força e sabedoria que me proporciona. Deus que nunca desampara, que não me fez desistir, que me reergueu e me fez vencedora.

Aos meus pais, verdadeiras joias raras, Marisa e Carlos, pelo imenso amor, pela excelente educação que me deram, pelo apoio e suporte de sempre. Nunca mediram esforços para ajudar, priorizando sempre meu estudo, formação pessoal e profissional. Praticantes da caridade e da bondade, me ensinando e mostrando diariamente o real significado do amor e os valores da vida.

À minha irmã Aline, verdadeiro significado da palavra “resiliência”, minha companheira de profissão, minha confidente, minha fonte de inspiração para a vida toda, que me abriu as portas para a Química, que me fornece todo apoio e seu imenso amor. O orgulho da nossa família, a “pequena grande mulher” que já venceu “gigantes”.

Ao meu eterno amor, Marcelo, meu melhor amigo, meu companheiro de longa data e para a vida toda, que me apoia em todos os meus projetos de vida pessoal e profissional. Meu grande incentivador que me ensina sempre a ser uma pessoa melhor a cada dia. Compartilhamos da mesma causa e lutamos juntos resgatando e salvando vidas. Meu presente de Deus, uma das melhores pessoas que já conheci e tenho o prazer de conviver.

Aos meus tios, Otávio, Maria José, Maria Helena, Roberto, José e Elvira, que nunca hesitaram em me apoiar e por sempre estarem presentes na minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio, pela atenção primordial, pela generosidade e pelos ensinamentos para a vida toda. Obrigada por acreditar em mim, no meu potencial e ter me fornecido caminhos alternativos para a conclusão deste lindo trabalho. Uma grande incentivadora da minha vida acadêmica.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires, pela disponibilidade e atenção, pela doçura e delicadeza em ensinar. Obrigada pela gentileza em sempre me receber em seu laboratório e me auxiliar nas escritas científicas.

Ao CEMPEQC, pela equipe integrante que sempre estava disposta a ajudar, em especial ao Prof. Dr. Rodrigo Marques e ao funcionário Adilson, pela confiança e disponibilidade de equipamentos que foram cruciais para a execução e desenvolvimento do trabalho.

Às minhas grandes amigas que o Instituto de Química me presenteou, Lilian Danielle de Moura Torquato e Rafaela Silva Lamarca. Minhas confidentes, que sempre me auxiliaram tanto nas atividades de laboratório quanto na vida pessoal. Obrigada pelas risadas que tornavam os meus dias mais leves e alegres. Levarei nossas amizades para sempre.

Aos amigos que fiz durante minha passagem pelo laboratório, que contribuíram de forma significativa e efetiva para a realização deste trabalho, como a Daiana, Danieli, Renan, Luan, Romário e Mateus.

Aos amigos sempre presentes em meu coração.

Em especial à minha avó Lydia (*in memoriam*) que com certeza está feliz em mais uma conquista em minha vida, fruto de muito apoio e incentivo que sempre recebi dela.

Ao Instituto de Química – Unesp, Araraquara, por construir a base sólida da minha vida acadêmica, pelo suporte e infraestrutura para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia – Unesp, Rio Claro, por conceder a infraestrutura e equipamentos necessários para as atividades científicas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa.

“Procure a sabedoria e aprenda a escrever os capítulos mais importantes de sua história nos momentos mais difíceis de sua vida.”

Augusto Cury

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo remover glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir da codigestão com vinhaça citrícola e obter ácidos graxos voláteis e álcoois, além de vetores energéticos como H_2 e CH_4 . Para tanto, o trabalho foi executado em dois cenários distintos: reatores anaeróbios em batelada em escala de laboratório para biossistemas integrados (1º estágio – fermentação, seguida do 2º estágio - metanogênese) e biossistema único com reator em escala aumentada para a metanogênese. Todos os reatores foram operados com concentrações crescentes de glicerol bruto e vinhaça citrícola. Para os biossistemas integrados foram avaliados dois inóculos no 1º estágio: inóculo I – consórcio anaeróbio fermentativo proveniente do lodo granular do reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) termofílico do tratamento de vinhaça da indústria sucroalcooleira, pré-tratado à quente e identificado em trabalhos anteriores como pertencente ao gênero *Clostridium* e inóculo II obtido do lodo granular do reator UASB mesofílico do tratamento de água residuária do abatedouro de aves. Foram realizados testes para a escolha do melhor pré-tratamento no inóculo II para a inibição da atividade metanogênica. Tanto para o 2º estágio dos biossistemas integrados quanto para o biossistema único foram utilizados o inóculo II sem pré-tratamento (*in natura*). A partir da escolha do melhor inóculo responsável pela maior geração de H_2 nos biossistemas integrados foram realizados testes com diferentes gliceróis brutos em condições otimizadas. No 1º estágio, com o inóculo I, ocorreu o favorecimento da rota oxidativa nos ensaios com concentrações reduzidas de substratos (10 g DQO L^{-1} e 20 g DQO L^{-1} nos respectivos ensaios 1 e 2), gerando 4,48 mmol $H_2 L^{-1}$ e 22,71 mmol $H_2 L^{-1}$ nos ensaios 1 e 2, respectivamente. Contrariamente, a rota redutiva foi favorecida com a geração de 1,3-propanodiol (1,3-PD) nos ensaios com concentrações elevadas de substratos (30, 40 e 40 g DQO L^{-1} ensaios 3, 4 e 5, respectivamente) sendo gerados 702, 1916 e 113 mg L^{-1} de 1,3-PD nos respectivos ensaios 3, 4 e 5. Gerações elevadas de CH_4 (229,08, 318,65, 275,87, 355,45 e 287,67 mmol $CH_4 L^{-1}$ para os respectivos ensaios 1', 2', 3', 4' e 5') foram verificadas no 2º estágio tanto pela presença da codigestão quanto da manutenção dos gêneros de *Methanosaeta* e *Methanosarcina* identificados em análises metagenômicas. Em contrapartida, os controles apresentaram gerações reduzidas de CH_4 (40,58, 35,89, 33,71 e 36,97 mmol $CH_4 L^{-1}$ para os respectivos controles 1', 2', 3' e 4'), reforçando o benefício do efeito sinérgico quando em codigestão. O melhor pré-tratamento imposto no inóculo II foi o ataque ácido. Assim, no 1º estágio com o inóculo II pré-tratado, elevadas concentrações de ácido láctico (1571, 2313, 3680 e 4768 mg L^{-1} , para os ensaios 6, 7, 8 e 9, respectivamente) se deveram à presença do gênero *Pediococcus*, identificado em análises metagenômicas. No 2º estágio foram obtidas gerações elevadas de CH_4 na codigestão (259, 199 e 268 mmol $CH_4 L^{-1}$ para os ensaios 6', 7' e 8', respectivamente). Nas condições otimizadas com o inóculo I foi verificado potencial mais elevado de geração de H_2 para o glicerol pré-tratado e, portanto, livre de sabão. Os resultados observados neste trabalho reforçam que as variações da rota metabólica foram ocasionadas pelo tipo de inóculo e substratos, além de suas diferentes concentrações impostas. Os ensaios em escala aumentada, operados com base nas concentrações otimizadas de substratos dos ensaios prévios, além da adição de esgoto sanitário, apresentaram gerações elevadas de CH_4 (2376, 1152, 2149, 2614, 768, 4755, 2394, 2530 e 1601 para os ensaios A à I, respectivamente). As informações obtidas com este estudo contribuirão para a aplicação da codigestão do glicerol bruto em projeções futuras, visando sua recuperação energética no abastecimento local de sua geração.

Palavras-chaves: Biodiesel. Biogás. Digestão Anaeróbia. Vinhaça Citrícola.

ABSTRACT

This study aimed to remove crude glycerol from the production of biodiesel from co-digestion with citrus vinasse and to obtain volatile fatty acids and alcohols, in addition to energy vectors such as H₂ and CH₄. For this purpose, the study was carried out in two different scenarios: anaerobic batch reactors on a laboratory scale for integrated biosystems (1st stage - fermentation, followed by the 2nd stage - methanogenesis) and single biosystem with increased scale reactor for methanogenesis. All reactors were operated with increasing concentrations of crude glycerol and citrus vinasse. For the integrated biosystems, two inocula were evaluated in the 1st stage: inoculum I - anaerobic fermentation consortium from the granular sludge of the UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) thermophilic reactor from the vinasse treatment of the sugar and alcohol industry, hot pre-treated and identified in works previous as belonging to the genus *Clostridium* and inoculum II obtained from the granular sludge of the mesophilic UASB reactor from the poultry slaughterhouse wastewater treatment. Assays were carried out to choose the best pre-treatment for inoculum II to inhibit methanogenic activity. Both for the 2nd stage of the integrated biosystems and for the single biosystem, inoculum II was used without pre-treatment (*in natura*). From the choice of the best inoculum responsible for the greatest generation of H₂ in the integrated biosystems, assays were carried out with different crude glycerols under optimized conditions. In the 1st stage, with inoculum I, the oxidative path was favored in the assays with reduced concentrations of substrates (10 g COD L⁻¹ and 20 g COD L⁻¹ in the respective assays 1 and 2), generating 4.48 mmol H₂ L⁻¹ and 22.71 mmol H₂ L⁻¹ in the assays 1 and 2, respectively. Conversely, the reductive route was favored with the generation of 1,3-propanediol (1,3-PD) in assays with high concentrations of substrates (30, 40 and 40 g COD L⁻¹ for assays 3, 4 and 5, respectively) 702, 1916 and 113 mg L⁻¹ of 1,3-PD were generated in the respective assays 3, 4 and 5. High CH₄ generations (229.08, 318.65, 275.87, 355.45 and 287.67 mmol CH₄ L⁻¹ for the respective assays 1', 2', 3', 4' and 5') were verified in the 2nd stage both by the presence of co-digestion and the maintenance of the genera of *Methanosaeta* and *Methanosarcina* identified by metagenomic analyzes. In contrast, the controls showed reduced generations of CH₄ (40.58, 35.89, 33.71 and 36.97 mmol CH₄ L⁻¹ for the respective controls 1', 2', 3' and 4'), reinforcing the benefit of the synergistic effect when co-digesting. The best pre-treatment imposed on inoculum II was the acid attack. Thus, in the 1st stage with pretreated inoculum II, high concentrations of lactic acid (1571, 2313, 3680 and 4768 mg L⁻¹, for assays 6, 7, 8 and 9, respectively) were due to the presence of the genus *Pediococcus*, identified in metagenomic analyses. In the 2nd stage, high generations of CH₄ were obtained in co-digestion (259, 199 and 268 mmol CH₄ L⁻¹ for assays 6', 7' and 8', respectively). In the conditions optimized with inoculum I, a higher potential for H₂ generation was verified for pre-treated glycerol and, therefore, free of soap. The results observed in this study reinforce that the variations in the metabolic route were caused by the type of inoculum and substrates, in addition to their different concentrations imposed. The scaled-up assays operated based on the optimized concentrations of substrates from the previous assays, in addition to the addition of sanitary sewage, showed high generations of CH₄ (2376, 1152, 2149, 2614, 768, 4755, 2394, 2530 and 1601 for the assays A to I, respectively). The information obtained from this study will contribute to the application of crude glycerol co-digestion in future projections, aiming at its energy recovery in the local supply of its generation.

Keywords: Anaerobic digestion. Biodiesel. Biogas. Citrus Vinasse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel na matriz energética brasileira.	45
Figura 2.2 - (a) representação em linhas gerais da reação de transesterificação na presença de metanol e catalisador; (b) etapas da reação de transesterificação.....	49
Figura 2.3 - Vias metabólicas para a codigestão glicerol e glicose em <i>Clostridium</i>	56
Figura 2.4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na codigestão anaeróbia do glicerol bruto e vinhaça citrícola.	57
Figura 4.1 – Fluxograma experimental geral	67
Figura 4.2 – Esquema operacional para os pré-tratamentos do inóculo II.....	70
Figura 4.3 - Representação geral dos reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais.....	72
Figura 4.4 - Codigestão do GBR em VC em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.	74
Figura 4.5 - Codigestão do GBR em VC em reatores anaeróbio em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo II após pré-tratamento ácido.	75
Figura 4.6 - Codigestão do GBRT em VC em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.	77
Figura 4.7 - Codigestão do GBV em VC em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.	78
Figura 4.8 - Codigestão do GBR em VC, diluídos em esgoto sanitário, em reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I...	79
Figura 4.9 - Sistema em aumento de escala: reator anaeróbio em batelada alimentado sob diferentes concentrações de substratos (GBR e VC).	80
Figura 4.10 - Sistema de medição volumétrica para quantificação de biogás.	86
Figura 4.11 - Diluições seriais do inóculo II para o plaqueamento.	90
Figura 5.1 - Visão geral dos microrganismos encontrados para a amostra 2 (inóculo II após o pré-tratamento ácido).	96
Figura 5.2 - Enriquecimento celular do inóculo II: (a) diluições 10^{-1} a 10^{-5} , (b) biomassa microbiana depositada no fundo do frasco na diluição 10^{-5} e (c) geração de biogás na diluição 10^{-5} com formação de bolhas no meio líquido.	98
Figura 5.3 - Plaqueamento com o meio Neomycin Nagler do inóculo II pré-tratado na diluição 10^{-5} para quantificação do consórcio anaeróbio gerador de H_2 em meio de cultivo específico para <i>Clostridium</i> sp.	99

Figura 5.4 - Análises de microscopia ótica após a purificação celular do inóculo II pré-tratado: (a) predomínio de bacilos gram-positivos e (b) bacilos com endósporos terminais. Ampliação de 1000 X.	99
Figura 5.5 - Variação temporal das remoções de glicerol (a) e glicose (b) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.	102
Figura 5.6 - Geração de H ₂ (mmol L ⁻¹) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.	104
Figura 5.7 - Rotas metabólicas para a cofermentação glicose-glicerol na codigestão (a) fermentação da glicose, (b) rota redutiva do glicerol e (c) rota oxidativa do glicerol.	106
Figura 5.8 - Visão geral da classificação biomolecular para a amostra 1 (inóculo II <i>in natura</i>).	111
Figura 5.9 - Visão expandida do filo Arquéia para a amostra 1 (inóculo II <i>in natura</i>).	112
Figura 5.10 - Geração de CH ₄ (mmol L ⁻¹) para os Ensaios e Controles: 1' (a), 2' (b), 3' (c), 4' (d) e 5' (e), operados em batelada com o inóculo II <i>in natura</i> a 37 °C.	117
Figura 5.11 - Variação temporal das remoções de glicerol (a) e glicose (b) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo II a 37 °C.	122
Figura 5.12 - Visão geral da classificação biomolecular para a amostra 3 (inoculo II pré-tratado ao final do ensaio 9).	124
Figura 5.13 - Geração de CH ₄ (mmol L ⁻¹) para os Ensaios e Controles: 6' (a), 7' (b), 8' (c) e 9' (d), operados em batelada com o inóculo II <i>in natura</i> a 37 °C.	127
Figura 5.14 - MEV do inóculo I com o predomínio de bacilos: (a) ampliado 1500 X (a) e (b) 5000 X.	130
Figura 5.15 - Variação temporal das remoções de glicerol (a) e glicose (b) para a codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto com VC nos ensaios 10, 11 e 12 em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.	133
Figura 5.16 - Geração de H ₂ (mmol L ⁻¹) nos ensaios 10, 11 e 12 operados com o inóculo I.	134
Figura 5.17 - Geração de CH ₄ (mmol L ⁻¹) nos ensaios 10', 11' e 12' operados com o inóculo II <i>in natura</i>	138
Figura 5.18 - Geração de biogás (mmol L ⁻¹) no reator de escala aumentada operado com o inóculo II <i>in natura</i>	143
Figura 5.19 - Curvas de rarefação para as amostras 1, 2 e 3.	149
Figura 5.20 - Abundâncias relativas para as amostras 1, 2 e 3, (a) filo, (b) classe, (c) ordem, (d) família, (e) gênero e (f) espécie.	150
Figura 5.21 - Perspectivas de Reuso Energético obtidas no presente estudo.	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Codigestão do glicerol bruto com outros resíduos.	54
Tabela 4.1 - Composição do meio de cultivo PYG modificado.	69
Tabela 4.2 - Composição dos ensaios A, B, C, D, E, F, G, H e I para o reator anaeróbio em aumento de escala.	81
Tabela 4.3 - Composição do Meio de Cultivo NN.	88
Tabela 4.4 - Composição do Meio de Cultivo DHL.	88
Tabela 4.5 - Composição do Meio de Cultivo NBGT.	88
Tabela 4.6 - Composição do Meio de Cultivo LBS.	88
Tabela 4.7 - Composição do Meio de Cultivo TATAC.	89
Tabela 4.8 - Composição do Meio de Cultivo VS.	89
Tabela 5.1 - Concentrações de H ₂ após os pré-tratamentos em pH 5,5, e 6,0 para o inóculo II.	93
Tabela 5.2 - Resultado da operação no 1º estágio (fermentação) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.	101
Tabela 5.3 - Resultado da operação no 2º estágio (metanogênese) para os efluentes da codigestão do GBR com VC nos ensaios operados em batelada com o inóculo II a 37 °C. .	110
Tabela 5.4 – Relações sintróficas entre bactérias e arqueias metanogênicas identificadas para o inóculo II <i>in natura</i>	116
Tabela 5.5 - Resultado da operação no 1º estágio (fermentação) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo II a 37 °C.	121
Tabela 5.6 - Resultado da operação no 2º estágio (metanogênese) para os efluentes da codigestão do GBR com VC nos ensaios operados em batelada com o inóculo II a 37 °C. .	126
Tabela 5.7 - Resultados da operação no 1º estágio (fermentação) para a codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto com VC em ensaios operados em batelada com o inóculo I, a 37 °C.	132
Tabela 5.8 - Resultados da operação no 2º estágio (metanogênese) para os efluentes da codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto com VC nos ensaios operados em batelada com o inóculo II a 37 °C.	137
Tabela 5.9 - Comparação dos estudos com reaproveitamento do glicerol codigeridos em outros substratos, operados em reatores em batelada.	139
Tabela 5.10 - Resultados de operação do reator em batelada em escala aumentada para 9 condições distintas (ensaios de A a I), na presença do inóculo II <i>in natura</i> , à temperatura ambiente.	142

Tabela 5.11 - Parâmetros de similaridade para as amostras 1, 2 e 3 do inóculo II..... 146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIOVE	Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APROBIO	Associação de Produtores de Biodiesel do Brasil
ATP	adenosina trifosfato
B1	adição de 1 % de biodiesel ao óleo diesel
B2	adição de 2 % de biodiesel ao óleo diesel
B3	adição de 3 % de biodiesel ao óleo diesel
B4	adição de 4 % de biodiesel ao óleo diesel
B5	adição de 5 % de biodiesel ao óleo diesel
B6	adição de 6 % de biodiesel ao óleo diesel
B7	adição de 7 % de biodiesel ao óleo diesel
B8	adição de 8 % de biodiesel ao óleo diesel
B10	adição de 10 % de biodiesel ao óleo diesel
B11	adição de 11 % de biodiesel ao óleo diesel
B12	adição de 12 % de biodiesel ao óleo diesel
B13	adição de 13 % de biodiesel ao óleo diesel
CEMPEQC	Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DHL	Desoxycholate hydrogen sulfide lactose
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ES	Esgoto sanitário
FID	Detector de Ionização por Chama
GBR	Glicerol Bruto advindo de óleos residuais domésticos
GBRT	Glicerol Bruto advindo de óleos residuais domésticos pré-tratado
GBV	Glicerol Bruto advindo de óleos vegetais virgens
GC	Cromatografia Gasosa
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
IBIOTEC	Instituto de Biotecnologia da Uniará
IPBEN	Instituto de Pesquisa em Bioenergia

IQ	Instituto de Química
LBS	Lactobacilli selective
L-cis	L-cisteína
LMA	Laboratório de Microscopia Avançada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MONG	Matéria Orgânica Não Glicerol
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NBGT	Neomycin brilliant green taurocholate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDCOM	Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis
NN	Neomycin nagler
OTU	Operational Taxonomic Unit
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNPB	Plano Nacional de Produção de Biodiesel
PRE	Perspectivas de Reuso Energético
PRONAF	Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar
PTT	tereftalato de polítrimetileno
PYG	Peptone, Yeast Extract e Glucose
RNA	ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossômico
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SCS	Selo Combustível Social
SE	Elétron Secundário
SRA	Sequence Read Archive
STV	Sólidos Totais Voláteis
TATAC	Triphenyl tetrazolium cholide acridine orange thallosulfate aesculin crystal violet
TCD	Detector de Condutividade Térmica
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VC	Vinhaça citrícola
VS	Veillonella selective
1,3-PD	1,3-propanodiol

2G

etanol de segunda geração

LISTA DE SÍMBOLOS

CH ₄	Gás metano
C ₃ H ₅ O ₃ Na	Lactato de Sódio
CH ₂ (SH)COONa	Ácido Tioglicólico
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂	Gás hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico anidro
kJ	Quilojoule
kV	Tensão de aceleração
L	Litros
M	mol L ⁻¹
MJ	Milijoule
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MWh	Megawatt-hora
N ₂	Gás nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico anidro
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ ⁺	Amônio
P	Potencial de produção de biogás (mmol L ⁻¹ cultura)

Rm	Taxa máxima de produção de biogás (mmol L^{-1} cultura. h)
Rpm	rotações por minuto
λ	Tempo de início da produção do biogás (h)
e	2,718281828
μA	Microampere
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	41
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	44
2.1	O avanço do biodiesel no Brasil	44
2.2	Matérias-primas para a produção de biodiesel	46
2.3	Glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel	49
2.4	Vinhaça citrícola.....	50
2.5	Codigestão de resíduos.....	51
2.6	Bioconversão do glicerol e glicose	55
2.7	Digestão anaeróbia em dois estágios sequenciais.....	57
2.8	Metabólitos secundários de valor agregado	59
2.9	Estudo da diversidade microbiana	62
2.10	Justificativa do presente estudo	63
3	OBJETIVOS	64
3.1	Geral.....	64
4	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1	Substratos	68
4.2	Inóculos	68
4.2.1	Inóculo II: Reativação para os reatores fermentativos	69
4.2.2	Pré-tratamentos no inóculo II.....	70
4.2.3	Enriquecimento do inóculo II pré-tratado	71
4.3	Reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais: fermentação e metanogênese	72
4.3.1	Avaliação da codigestão do GBR em VC	73
4.3.2	Análises da codigestão para cenários distintos com o inóculo de maior potencial de geração de H ₂	76
4.1	Reator anaeróbio em batelada em estágio único e aumento de escala: metanogênese 80	
4.2	Análises físico-químicas e cromatográficas.....	81
4.2.1	Concentração de glicerol	81
4.2.2	pH.....	83
4.2.3	Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	83
4.2.4	Carboidratos Totais	83
4.2.5	Metabólitos secundários	83
4.3	Determinação de biogás	85

4.4	Microscopias.....	86
4.4.1	Microscopia ótica.....	86
4.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	87
4.5	Análise dos consórcios anaeróbios.....	87
4.5.1	Enumeração de bactérias produtoras de H ₂ no inóculo II pré-tratado por técnica de <i>pourplate</i>	87
4.5.2	Biologia Molecular e Bioinformática.....	90
4.6	Cálculo de Perspectiva de Reuso Energético (PRE).....	91
4.7	Ajuste dos dados experimentais.....	92
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1	Avaliação de H ₂ após os pré-tratamentos no inóculo II.....	93
5.2	Enriquecimento celular do inóculo II.....	97
5.3	Contagem das colônias no inóculo II.....	98
5.4	Reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais: Fermentação e Metanogênese.....	100
5.4.1	Biossistemas Fermentativos (1º Estágio) operados com o inóculo I.....	100
5.4.2	Biossistemas Metanogênicos (2º Estágio) operados com o inóculo I.....	108
5.4.3	Biossistemas Fermentativos (1º Estágio) operados com o inóculo II.....	120
5.4.4	Biossistemas Metanogênicos (2º Estágio) operados com o inóculo II.....	124
5.4.5	Análises da codigestão para cenários distintos em ensaios operados com o inóculo I.	129
5.4.6	Biossistemas Fermentativos – Ensaios 10,11 e 12.....	131
5.4.7	Biossistemas Metanogênicos – Ensaios 10’,11’ e 12’.....	136
5.5	Comparação com outros estudos.....	138
5.6	Geração de biogás em reator de escala aumentada.....	141
5.7	Comparação da comunidade microbiana frente às condições impostas para o inóculo II.	146
5.8	Perspectivas de Recuperação Energética (PRE).....	156
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	160
7	CONCLUSÕES	162
8	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO PRESENTE ESTUDO	164
	REFERÊNCIAS	165
	ANEXO A – Determinação de glicerol pelo método físico-químico para os ensaios fermentativos de 1 a 5, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos.	179
	ANEXO B – Determinação de glicerol pelo método físico-químico para os ensaios fermentativos de 6 a 9, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos.	180

ANEXO C – Determinação de glicerol e 1,3-PD pelo método cromatográfico para os ensaios fermentativos de 10 a 12, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos, além dos ensaios de A e I.	181
ANEXO D – Obtenção da curva de calibração para DQO.	182
ANEXO E – Obtenção da curva de calibração para carboidratos totais – glicose.....	183
ANEXO F – Curva de calibração para determinação dos metabólitos secundários por Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID).....	184
ANEXO G – Curva de calibração para determinação dos metabólitos secundários por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).	185
ANEXO H – Determinação de ácido láctico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	186
ANEXO I – Determinação da composição do biogás via Cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização por chama (FID) e detector de condutividade térmica (TCD).	187

1 INTRODUÇÃO

A indústria do biodiesel tem mostrado um enorme crescimento nos últimos anos, onde a sua produção no Brasil tem sido encorajada pelas leis governamentais com porcentagens crescentes deste biocombustível à matriz energética brasileira, visando substituir o óleo diesel de origem fóssil. Esta adição ocorreu gradualmente com os anos, prevalecendo 10 % (B10) de biodiesel atualmente. Especulações otimistas de acordo com a Resolução 16 de 2018, do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), apontam a elevação desse percentual até 15 %, o que deverá ocorrer em 2023 (“ANP”, 2021).

No Brasil, as principais matérias-primas empregadas para a produção de biodiesel correspondem majoritariamente ao óleo de soja (68,30 %), seguida da gordura bovina (12,99 %), outros materiais graxos (12,78 %), gordura de porco (2,05 %) e outras matérias-primas dentre elas óleo de algodão, óleo de fritura, gordura de frango, óleo de palma, de dendê e de milho, somando 3,88 % da produção nacional (“ANP”, 2019). O maior problema da comercialização do biodiesel refere-se ao custo requerido para as matérias-primas convencionais como óleos vegetais virgens ou gorduras animais (SARMA et al., 2012).

Uma aplicação ambientalmente sustentável para o óleo de cozinha usado seria sua reutilização para a produção de biodiesel, uma vez que é observada a redução de custos da produção de 60-70 % (GUPTA; YADAV; RATHOD, 2015). De acordo com a Associação de Produtores de Biodiesel do Brasil (APROBIO), a cada 1 litro de óleo de cozinha usado são gerados cerca de 980 mililitros de biodiesel (“APROBIO”, 2017). Além disso, destaca-se a diminuição dos problemas associados com a disposição inadequada do óleo de cozinha usado, podendo causar a poluição da água e do solo (GUPTA; YADAV; RATHOD, 2015).

Com a produção global de biodiesel passando dos 20 bilhões de litros, elevadas concentrações do coproduto desta produção estão sendo geradas, que corresponde ao glicerol bruto, sendo que para cada 100 kg de biodiesel produzidos, são gerados 10 kg de glicerol bruto (RODRIGUES et al., 2019a). Este excesso de glicerol bruto tem uma grande dificuldade em ser absorvido pelas indústrias convencionais que fazem o seu consumo, como as indústrias farmacêutica e alimentícia, devido ao fato deste resíduo conter várias impurezas como metanol, sabão, ácidos graxos livres e triglicerídeos, provenientes do processo da transesterificação, e assim, purificá-lo corresponde a um processo oneroso (HEJNA et al., 2016).

Diante deste cenário, surgem as necessidades de serem desenvolvidos usos alternativos para o glicerol bruto a fim de tornar a produção de biodiesel sustentável a longo prazo. Deste

modo, o valor deste resíduo como substrato em plantas de digestão anaeróbia se mostra uma solução promissora, sendo considerado uma matéria-prima preferida para a produção de biogás como o CH₄ (metano) e o H₂ (hidrogênio) (RODRIGUES et al., 2019a), além de ser usado para a geração de produtos com valor agregado como 1,3-propanodiol (1,3-PD) (VERAS et al., 2019); ácido propiônico (HASHEMI; ROOHI, 2019) e ácido lático (ABDULLAH; YAACOB; BASIR, 2020).

A codigestão corresponde à digestão simultânea de uma mistura homogênea de dois ou mais substratos com características complementares entre si, a fim de fornecer nutrientes em quantidades equilibradas, permitindo dessa forma uma fermentação estável (MARAGKAKI et al., 2017; SILVA et al., 2017). Codigerindo o glicerol bruto com outros resíduos facilitaria, portanto, o seu consumo pelos microrganismos, uma vez que podem ser encontrados baixos teores de glicerol nesta matriz com elevadas porcentagens de metanol e sabão, sendo estes últimos considerados como contaminantes e tóxicos para a atividade microbiológica (RODRIGUES et al., 2016; SARMA et al., 2013; SELEMBO et al., 2009).

A codigestão do glicerol bruto pode ser feita por meio de biosistemas em dois estágios sequenciais: fermentação seguida de metanogênese. Na fermentação, a produção de H₂ é sempre acompanhada pela geração de ácidos graxos voláteis, tais como os ácidos acético, butírico e propiônico, por exemplo, além de gerar também álcoois como etanol, butanol e propanol. Nestes biosistemas integrados, a fração líquida proveniente da fermentação é utilizada como substrato ideal para a produção de CH₄ no 2º estágio, otimizando o uso da matéria orgânica remanescente do 1º estágio (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; SILVA et al., 2018).

Diversos resíduos orgânicos industriais podem ser utilizados na codigestão anaeróbia, em destaque os provenientes do processamento de frutas cítricas e o esgoto sanitário. O Brasil corresponde ao principal país produtor de cítricos no mundo. O Estado de São Paulo é o mais representativo, com 12,3 milhões de toneladas (73 % da produção nacional) (PACHIEGA et al., 2019a). O processamento de cítricos é baseado principalmente na extração de suco, deixando como resíduos as cascas (60-75 %), membranas segmentadas (30-35 %) e sementes (10 %) que são principalmente compostas por carboidratos altamente fermentáveis, correspondendo a milhões de toneladas geradas anualmente na produção do suco desta fruta. Assim, a disposição desses resíduos em aterros, além de ser dispendiosa, pode aumentar a geração de CH₄, causando graves impactos ambientais (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013; TORQUATO et al., 2017).

A grande alternativa promissora e lucrativa para estes resíduos consiste na obtenção do etanol de segunda geração (2G) por meio da fermentação de monômeros de carboidratos desta biomassa citrícola. Similar à produção de bioetanol através da cana-de-açúcar, quantidades significativas de vinhaça são geradas do processamento do etanol 2G do resíduo citrícola (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013; TORQUATO et al., 2017). A vinhaça da indústria dos cítricos é caracterizada por seu elevado teor de matéria orgânica e nutrientes sendo um substrato promissor para a geração de H₂ na fermentação (TORQUATO et al., 2017), podendo servir na codigestão do glicerol bruto.

O esgoto sanitário corresponde a um excelente substrato rico em fósforo e contém 99,9 % de água, podendo diluir o glicerol bruto durante a digestão anaeróbia. Assim, a codigestão com resíduos orgânicos ricos em nitrogênio, como esgoto sanitário, poderia ser uma estratégia adequada para diminuir a sobrecarga orgânica ocorrida durante o sistema de monodigestão (RODRIGUES et al., 2020a).

Dessa forma, a codigestão anaeróbia do glicerol bruto com vinhaça citrícola e em alguns casos com esgoto sanitário pode ser uma excelente solução integrada para a gestão destes resíduos, gerando simultaneamente produtos que tenham valor agregado, como o 1,3-propanodiol, ácido propiônico e ácido láctico, além de gerar bioenergia (H₂ e CH₄). Nesse sentido, o objetivo principal desta pesquisa foi investigar a codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto, provenientes da produção de biodiesel, juntamente com vinhaça citrícola, em dois cenários distintos: reatores anaeróbios em batelada em escala reduzida para biosistemas integrados (1° estágio – fermentação, seguida do 2° estágio - metanogênese) e reator em escala aumentada para a metanogênese, visando à geração de produtos de valor agregado e biogás.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O avanço do biodiesel no Brasil

O Brasil possui enorme potencial energético, sendo que, além das reservas de petróleo e gás natural, as fontes renováveis surgem como forma de minimizar o efeito estufa e ampliar a geração de energia. Os combustíveis fósseis mais utilizados no Brasil são a gasolina e o óleo diesel, ambos derivados do petróleo. Devido à preocupação com o futuro esgotamento dessa fonte de energia, associada aos danos ambientais decorrentes de seu uso, o etanol e o biodiesel surgiram como alternativas, tornando-se os biocombustíveis mais consumidos no país (VIEIRA; NADALETI; SARTE, 2021).

Na década de 1970 foi criado, no Brasil, o maior programa de biocombustíveis do mundo, o “Proálcool”, com a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar visando a substituição da gasolina, como uma reação à elevação do preço do petróleo, que era importado pelo país. A geração de etanol só foi possível devido à disponibilidade de grandes áreas de terra para a produção de culturas energéticas. Nas décadas seguintes, os preços do petróleo passaram a ficar mais baixos em todo o mundo, fazendo o programa extinguir. Em contrapartida, o desenvolvimento de veículos *flex* garantiu a continuação da produção de etanol como combustível (MURTA et al., 2021).

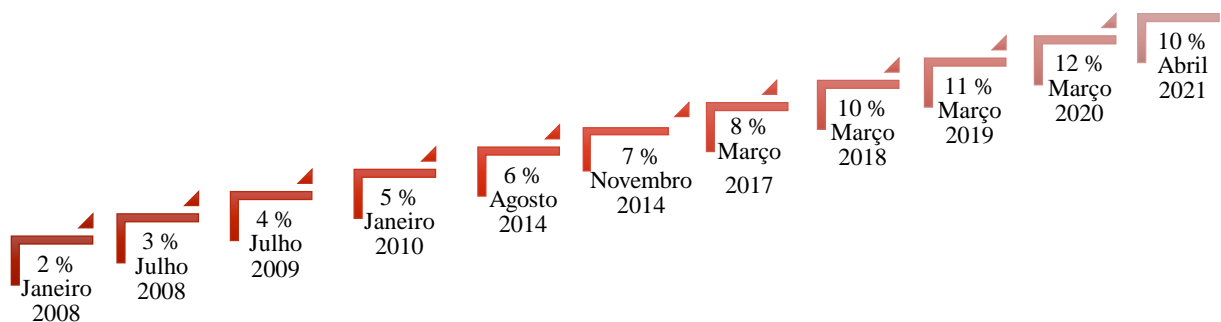
Em relação à produção de biodiesel, o Brasil ainda não realizou um programa comparável ao Proálcool. Para incentivar o cultivo de oleaginosas com essa finalidade, o governo federal criou, em 2003, por meio do decreto nº 07/02/2003, o Plano Nacional de Produção de Biodiesel (PNPB) (MURTA et al., 2021). O PNPB oferece um enquadramento institucional e regulatório, bem como incentivos e subsídios para estimular a produção e o uso do biodiesel. Este plano governamental também tem forte foco no desenvolvimento regional e na inclusão social por meio da geração de emprego e renda nas regiões mais pobres do país, garantindo desta forma a redução da dependência da importação de combustível fóssil (DUTRA; CARPIO, 2021; IANDA; PADULA, 2020).

Como um dos objetivos norteadores do PNPB era promover a inclusão social, foi criado o Selo Combustível Social (SCS), instituído por meio de Decreto Nº 5297, de 6 de dezembro de 2004. O SCS compreende num mecanismo de atribuição de selo aos produtores de biodiesel que adquirissem um percentual mínimo de matérias-primas dos agricultores familiares que, por sua vez, eram associados de cooperativas rurais cadastradas no Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF). Assim que os produtores receberam o selo,

eles tiveram prioridade para vender seu combustível por meio de leilões públicos, realizados pela ANP (GOV.BR, 2019; OLIVEIRA; COELHO, 2017).

Além de todas as ações de incentivos governamentais do PNPB para a produção de biodiesel, destaca-se a aprovação da lei n° 11.097/2005, que estabeleceu a adição obrigatória de 2 % (B2) de biodiesel ao óleo diesel no Brasil, em 2008. Desde então, a produção de biodiesel atendeu essa demanda e o setor vem se desenvolvendo rapidamente (“ANP”, 2021). Em julho de 2008, a adição de biodiesel ao diesel passou a 3 % (B3), atingindo 4 % (B4) a partir de julho de 2009, 5 % (B5) em janeiro de 2010, 6 e 7 % (B6 e B7) em agosto e novembro de 2014, respectivamente (CÉSAR et al., 2019). Uma nova lei (No. 613/2015) de 23 de março de 2016 estabeleceu a adição de 8 % (B8) de biodiesel ao diesel em março de 2017, 10 % (B10) em março de 2018, 11 % (B11) em março de 2019, 12 % (B12) em março de 2020 e 13 % (B13) em março de 2021 (“ANP”, 2021; GUABIROBA et al., 2017). Porém, uma nova Resolução n° 4, de 9 de abril de 2021, estabeleceu a redução do teor da mistura obrigatória do biodiesel no óleo diesel de 13 % para 10 %, no 79° Leilão de Biodiesel, devido à elevação do preço do litro deste biocombustível (CNPE, 2021) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel na matriz energética brasileira.



Fonte: Elaboração própria, 2021

Apesar dos aumentos da mistura de biodiesel ao óleo diesel para os anos seguintes, em algumas capitais nacionais, a B20 (20 % de biodiesel com 80 % de diesel convencional) já é uma realidade. Em São Paulo, por exemplo, a chamada EcoFrota tem mais de 3070 ônibus usando B20. Segundo RODRIGUES, (2017), a adoção de combustíveis renováveis na frota paulista de ônibus pode evitar 12,7 mil mortes nos próximos 33 anos, já que a substituição do diesel por biodiesel reduz as emissões de gases nocivos como o CO₂ em até 70 %. Em Curitiba, capital do Paraná, a frota de transporte público utiliza biodiesel desde 2009 e em 2011 foi

lançado um ônibus chamado MegaBRT sendo abastecido com 100 % de biodiesel (CREMONEZ et al., 2015).

Os futuros desafios relacionados à obtenção do biodiesel devem envolver o desenvolvimento de novos processos de transesterificação com a possibilidade de redução dos coprodutos e custos com a separação e purificação do biodiesel, incluindo políticas subsidiárias de base para financiar o cultivo de oleaginosas, garantindo o preço, infraestrutura, logística de transporte, segmento de tecnologia, ressaltando a investigação para os novos usos do glicerol, coproduto deste processo (ANWAR, 2021).

2.2 Matérias-primas para a produção de biodiesel

A escolha das matérias-primas para a produção de biodiesel não é um padrão para todos os países ou regiões. Fatores básicos como custo e disponibilidade local podem desempenhar um papel importante na seleção da matéria-prima, sendo estas classificadas como de primeira e segunda geração. Os biodieseis formados com as matérias-primas de primeira geração se tornaram populares principalmente nos países mais desenvolvidos economicamente, onde nenhum problema foi visto quanto ao uso de alimentos como combustível, como os óleos de palma, soja, girassol, mostarda, colza, amendoim, coco, etc. No entanto, matérias-primas de segunda geração estão sendo investigadas devido à sua natureza não comestível, sendo vista como um benefício para minimizar a escassez de alimentos, como os óleos residuais domésticos, de jatobá, semente de algodão, sebo, moringa, etc (ANWAR, 2021).

Até o momento, o grande obstáculo à comercialização do biodiesel compreende no custo requerido para a sua produção. O preço do litro de biodiesel era de cerca de R\$ 4,94, enquanto a gasolina e o diesel custavam cerca de R\$ 3,23 e R\$3,57, respectivamente, durante o mês de outubro de 2020 (RODRIGUES et al., 2020a). A exploração de resíduos para a obtenção de biodiesel pode ser útil para reduzir o custo da matéria-prima, o que torna o processo econômico, uma vez que a utilização de óleos vegetais virgens representa 80 % do custo da produção total de biodiesel (RODRIGUES et al., 2020a; TOPARE; PATIL, 2021).

O óleo residual doméstico pode ser uma matéria-prima para a produção de biodiesel, apresentando duplo benefício, o econômico e o ambiental (GAUR et al., 2020). Os resíduos de óleo de cozinha de residências, comércio e indústria são potencialmente poluentes quando descartados de forma inadequada, pois 1 litro de óleo de cozinha pode contaminar até 20.000 litros de água, podendo ser difícil a sua degradação por processos biológicos além de levar à formação de filmes, obstruindo a passagem de oxigênio para a água, aumentando assim a carga

orgânica em corpos d'água (poluição), tendo um impacto negativo na vida aquática (CÉSAR et al., 2017). Alternativas que viabilizem sua reciclagem são requeridas, promovendo assim um equilíbrio entre as necessidades ambientais, econômicas e sociais (MIRANDA et al., 2018).

Assim, a conversão do óleo residual doméstico em biodiesel pode eliminar automaticamente esses problemas, além do que ele se encontra disponível em abundância e pode ser facilmente obtido a um preço mínimo (DHAWANE et al., 2018; SAHAR et al., 2018). Como resultado, o custo de fabricação do biodiesel é reduzido drasticamente de 75 % a 95 % (TOPARE; PATIL; KHEDKAR, 2021). Além disso, o preço do litro do óleo residual doméstico em São Paulo, Brasil, era cerca de R\$ 1,24 (CEMPRE, 2017), enquanto o óleo de soja era de R\$ 5,36 (ABIOVE, 2021a).

De acordo com o relatório da SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) (“Sabesp”, 2019), em 2010, somente 2,5 a 3,5 % do óleo comestível descartado no Brasil foi reciclado. Segundo dados da ANP e da ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais), no ano de 2019, contabilizou-se 88.439 m³ de óleo residual doméstico alocados para a produção de biodiesel, superpassando o ano de 2017 com 55.408 m³ (ABIOVE, 2021b).

Assim, a utilização de óleo residual doméstico para a produção de biodiesel já é uma realidade em algumas indústrias brasileiras. Em 2018 cerca de 12,5 % da produção total de biodiesel da JBS Biodiesel foi proveniente do reaproveitamento de óleo de fritura usado, o que representa cerca de 32,5 milhões de litros de biodiesel fabricados a partir da reciclagem de óleo de fritura (RODRIGUES, 2019). Em Araraquara/SP, uma planta de produção de biodiesel em escala piloto da Universidade de Araraquara chega a produzir cerca de 85 L de biodiesel a partir de 80 L de óleos residuais domésticos (coletados de residências, escolas públicas e lojas), utilizando 20 L de metanol (álcool de cadeia curta) e 30 % de hidróxido de sódio (catalisador) pré-diluídos neste álcool, gerando 15 L de glicerol bruto. O biodiesel produzido abastece caminhões que coletam o óleo de cozinha usado, na proporção de 50 % diesel e 50 % biodiesel, visando uma redução de custos de 50 % (RODRIGUES et al., 2016). Segundo dados da ANP a produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras reaproveitados representou 88,2 milhões de litros em 2018 (“ANP”, 2021).

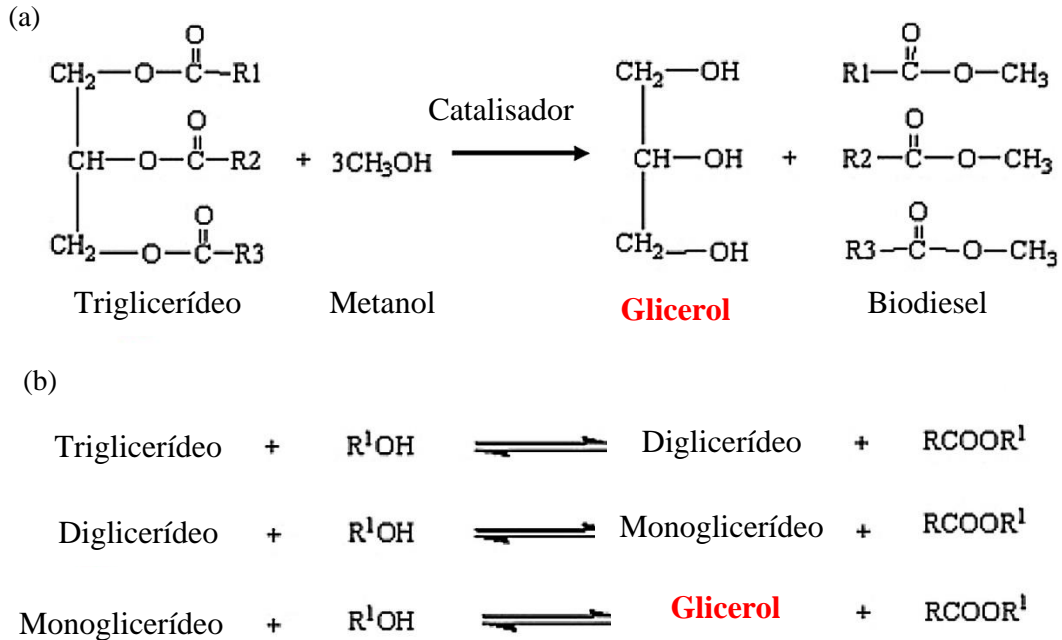
Convencionalmente, triglicerídeos como os óleos residuais domésticos podem ser convertidos em biodiesel por meio da reação de transesterificação, onde são transformados em metil éster de ácidos graxos (biodiesel) com viscosidade semelhante ao combustível diesel. A reação de transesterificação requer elevadas quantidades de álcool (metanol ou etanol) como forma de deslocar o equilíbrio da reação em favorecimento da produção de biodiesel, sendo

comumente realizada na presença de catalisadores alcalinos como o hidróxido de sódio ou potássio devido aos preços baixos (Figura 2.2 a). A mistura é agitada e aquecida até a temperatura de ebulição do álcool. A reação acontece em sucessivas etapas, onde os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, seguido pela reação subsequente dos diglicerídeos em monoglicerídeos e, em seguida, em glicerol, resultando em uma molécula de metil éster em cada etapa (ATHAR; ZAIDI, 2020) (Figura 2.2 b). Ao final da reação ocorre uma separação da mistura em duas fases, sendo a fase superior correspondente ao metil éster de ácidos graxos e a fase inferior, ao glicerol bruto contendo o excesso de álcool que não reagiu, sais e substâncias sólidas presentes nas matérias-primas.

Apesar do grande incentivo e benefícios da utilização dos óleos residuais domésticos para a obtenção de biodiesel, algumas limitações podem ser encontradas durante o processo de transesterificação, que acabam por gerar um coproduto carregado de impurezas. O obstáculo mais difícil para usar essas matérias-primas de resíduos baratos na produção de biodiesel é a existência de uma grande quantidade de ácidos graxos livres, pois eles reagem prontamente com o catalisador básico na reação de transesterificação para formar sabões alcalinos (ELGHARBAWY et al., 2021).

O processo de fritura do óleo de cozinha envolve o aquecimento em temperaturas de 160 a 200 °C, fazendo com que sejam degradados através de reações de hidrólise, oxidação e craqueamento, resultando em aumento da viscosidade, água e acidez com a geração de ácidos graxos livres (DIYA'UDDEEN et al., 2012). A presença de água no óleo residual doméstico leva à hidrólise e elevadas taxas de ácidos graxos livres leva à formação de produtos saponificados que consomem parcialmente o catalisador empregado, resultando em baixos rendimentos de biodiesel gerado e dificuldades na separação com o seu coproduto, o glicerol (ZAVARIZE; BRAUN; DE OLIVEIRA, 2021). De acordo com DIYA'UDDEEN et al., (2012), apesar destas limitações, várias abordagens têm sido feitas a fim de se resolver o problema e um rendimento ótimo de 99,3 % já foi registrado para a geração de biodiesel a partir de óleo residuais domésticos.

Figura 2.2 - (a) representação em linhas gerais da reação de transesterificação na presença de metanol e catalisador; (b) etapas da reação de transesterificação.



Fonte: Adaptado de ATHAR; ZAIDI, (2020)

2.3 Glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel

Como consequência do crescente aumento da produção de biodiesel, grandes volumes de glicerol bruto, o coproduto da reação de transesterificação, estão sendo gerados, onde para cada 100 kg de biodiesel, são obtidos cerca de 10 kg de glicerol bruto (RODRIGUES et al., 2020b).

Anualmente, 2,66 milhões de toneladas de glicerol bruto são gerados de acordo com a demanda de 30 milhões de toneladas de biodiesel produzidos (KUMAR et al., 2021). Esse elevado volume de glicerol bruto acarreta problemas ambientais quando dispostos de maneira inadequada em corpos d'água, pois contém impurezas como sabão, metanol, resíduos de catalisadores, ácidos graxos livres, triglicerídeos que não reagiram no processo de transesterificação além de produtos intermediários da reação como diglicerídeos e monoglicerídeos, sendo, portanto, prejudiciais à vida aquática (RODRIGUES et al., 2020b). As concentrações de cada componente no glicerol bruto dependem tanto do óleo empregado como matéria-prima quanto do processo utilizado para a síntese de biodiesel, sendo que teores de

glicerol abaixo dos 30 % são bastante comuns dependendo da eficiência do processo de produção e da qualidade de separação de fases ao final da reação de transesterificação (RODRIGUES, 2016).

No entanto, as tecnologias para a purificação do glicerol residual são escassas e economicamente inviáveis (BASKARAN et al., 2021). Uma diminuição substancial no preço do glicerol bruto foi observada, passando de R\$ 3,00/kg para R\$ 0,62/kg. Além disso, o custo de purificação do glicerol bruto para atingir um nível comercial pode chegar a R\$ 280/kg, enquanto o preço de mercado do glicerol puro é de R\$ 6–84 /kg (KUMAR et al., 2021).

Assim, o glicerol bruto corresponde a um problema global devido à falta de capacidade de refino, inviabilizando seu uso direto no mercado tradicional no qual poderia ser absorvido, como as indústrias farmacêuticas e alimentícias, resultando numa queda dramática de seus preços, criando um excesso de glicerol no mercado. Quando a produção de glicerol é maior do que a demanda, o glicerol torna-se um resíduo ao invés de um produto (RODRIGUES et al., 2020b, 2020a). Porém, usando o glicerol bruto como substrato para bioconversões à produtos de valor agregado como 1,3 propanodiol e biogás (H_2 e CH_4), por digestão anaeróbia, o custo de produção de biodiesel pode ser reduzido, além de fornecer um destino adequado e ambientalmente amigável para este resíduo.

2.4 Vinhaça citrícola

Atualmente, a produção anual de laranja no mundo é estimada em cerca de 124 milhões de toneladas, sendo o Brasil o seu maior produtor, representando 47 % da produção mundial, seguido pelos Estados Unidos com 29 % (BELUOMINI; STRADIOTTO; BOLDRIN, 2021; SHARMA et al., 2017). Dentro dessas estatísticas, no Brasil, o Estado de São Paulo é o mais representativo com a produção anual de 12,3 milhões de toneladas, representando 73 % da produção do país (PACHIEGA et al., 2019b).

A produção mundial de cítricos leva à geração de 40 milhões de toneladas de resíduos anualmente (MAHATO et al., 2020). O total de resíduos citrícolas gerados durante o processamento da laranja pelas indústrias brasileiras foi de cerca de 8,4 milhões de toneladas (PACHIEGA et al., 2019; TORQUATO et al., 2017).

O processamento da laranja é baseado principalmente na extração do suco. Entretanto, o cultivo desta fruta também é utilizado para a produção de diversos derivados, seja na indústria química para a produção de flavonóides, óleos essenciais, biocombustíveis, limoneno e pectina

ou na indústria de alimentos para produção de enlatados, doces e fibra alimentar solúvel (TORQUATO et al., 2017).

Com isso, são deixados como resíduos do processamento as cascas (60-75 %), membranas segmentadas (30-35 %) e sementes (10 %) que são principalmente compostas por carboidratos altamente fermentáveis. Assim, a disposição desses resíduos em aterros, além de ser dispendiosa, pode aumentar a geração de CH₄, causando graves impactos ambientais (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013; TORQUATO et al., 2017).

Normalmente, após a secagem e prensagem, esse resíduo sólido é utilizado para produzir os pellets de polpa cítrica, utilizados como suplemento para ração bovina, o que não é uma solução econômica (TORQUATO et al., 2017).

A grande alternativa promissora e lucrativa para estes resíduos consiste na obtenção do etanol de segunda geração (2G) por meio da fermentação de monômeros de carboidratos desta biomassa citrícola. Similar à produção de bioetanol através da cana-de-açúcar, quantidades significativas de vinhaça são geradas após o processamento do etanol 2G do resíduo citrícola (AWAN; TSUKAMOTO; TASIC, 2013; TORQUATO et al., 2017).

Antes de ser descartada, a vinhaça citrícola gerada necessita de tratamento adicional devido ao alto teor de matéria orgânica e nutrientes, além de apresentar pH ácido e ser corrosivo. Isso acaba gerando custos adicionais que tornam o processo de tratamento inviável. Porém, se descartada de forma inadequada pode causar diversos impactos ambientais incluindo poluição de água e lençóis freáticos, representando toxicidade para os organismos aquáticos. Ao invés de prejudicial, este resíduo pode transformar os efluentes da citricultura em substratos promissores para a geração de biogás e produtos de valor agregado na digestão anaeróbia (TORQUATO et al., 2017).

2.5 Codigestão de resíduos

O glicerol bruto corresponde a um excelente substrato para a digestão anaeróbia, fornecendo carbono e energia para os microrganismos. Entretanto, este resíduo contém baixo teor de nitrogênio e elevada concentração de matéria orgânica, que podem desfavorecer a digestão anaeróbia, dificultar a difusão, levar à acumulação de inibidores e reduzir o acesso dos microrganismos aos substratos (MONTROYA, 2019). Ainda assim, fatores inadequados como pH, temperatura e alcalinidade podem inibir a atividade microbológica (RODRIGUES et al., 2020a; SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019a).

A codigestão do glicerol bruto com outros resíduos orgânicos pode ser uma estratégia adequada a fim de reduzir a sobrecarga orgânica ocorrida durante o processo de monodigestão (RODRIGUES et al., 2020a). Além disso, podem ser obtidas concentrações equilibradas de nutrientes, alcalinidade suficiente, podendo ser atingidos grandes desempenhos diante da otimização da razão carbono-nitrogênio (C/N), possibilitando aumento da produção de biogás e produtos de valor agregado a partir da mistura de substratos (LEI et al., 2019).

RODRIGUES et al., (2020a) estudaram a codigestão do glicerol bruto com esgoto sanitário em reatores anaeróbios em batelada a 30 °C na presença de cultura mista. Os autores concluíram que a codigestão proporcionou efeitos sinérgicos e complementares fornecendo uma quantidade equilibrada de nutrientes, como o nitrogênio e fósforo provenientes do esgoto sanitário, além de diluir substâncias tóxicas nocivas e excessivas presentes no glicerol bruto, que poderiam inibir a atividade do consórcio anaeróbio durante a operação. Além disso, a utilização do esgoto sanitário pode ocasionar a redução de custos de operação dos reatores, uma vez que são evitados o uso de meios sintéticos.

Segundo KURAHASHI et al., (2017), a codigestão pode aumentar a atividade de microrganismos anaeróbios, tendo em vista que uma mistura adequada de resíduos proporciona efeitos sinérgicos que compensam a falta de carbono e demais nutrientes de alguns substratos, ao mesmo tempo em que diluem substâncias nocivas ou excessivas que possam inibir a atividade destes microrganismos. Além disso, a codigestão pode resultar em produções de biogás mais elevadas, podendo representar aumentos de 25 % a 400 % sob a mono digestão das mesmas matérias-primas, com uma melhoria na remoção da matéria orgânica (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; RAZAVIARANI; BUCHANAN, 2015). Vantagens ecológicas, tecnológicas e econômicas são obtidas com a codigestão, uma vez que propiciam concomitantemente o tratamento dos resíduos orgânicos envolvidos no processo (SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019a).

Neste contexto, a glicose pode ser usada como cosubstrato na fermentação do glicerol bruto. Alguns autores relataram o aumento de biogás com essa codigestão, como SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, (2019), onde a glicose serviu como um substrato doador de H⁺ fornecendo equivalentes redutores e ATP (adenosina trifosfato) para a célula microbiana, sendo diretamente induzido na glicólise como glicose 6-fosfato e convertido em CH₄ (SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019a).

Além disso, YUN et al., (2021) observaram o efeito da codigestão da glicose e glicerol para o aumento na produção de 1,3-PD, fornecendo uma razão de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) para NAD⁺ elevada quando comparada à fermentação do glicerol

sozinho. A codigestão de ambos os resíduos fez a produção de acetato dobrar. Os autores observaram que quando *C. butyricum* usava glicose como único substrato, o butirato era o produto principal. No entanto, o metabolismo da glicose mudou da produção de butirato para acetato na presença de glicerol. O aumento da formação de acetato elevou a produção de NADH e ATP (XIN et al., 2016). Este estudo confirmou a viabilidade do aumento da produção de 1,3-PD com a codigestão de glicerol-glicose (YUN et al., 2021).

Entretanto, estudos envolvendo a codigestão do glicerol e resíduos com glicose ainda são escassos. Outros resíduos como efluente da fabricação de óleo de palma (PRASERTSAN et al., 2021) (SEEKAO et al., 2021), fase aquosa de liquefação hidrotérmica de esterco suíno (WANG et al., 2021b), lixiviado de estação de tratamento de resíduos sólidos urbanos (BERNAT et al., 2021), e água residuária do processamento da mandioca (MEIER et al., 2020) foram explorados em cofermentação com o glicerol bruto (Tabela 2.1).

PRASERTSAN et al., (2021) utilizaram como cosubstrato o efluente da fabricação de óleo de palma para ser codigerido com o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos. Os ensaios foram operados em batelada, a 37 °C, com a adição de 1 % v/v de glicerol bruto, 200 mL do efluente da fabricação do óleo de palma, e a razão 2:1 de resíduos:inóculo. Os autores concluíram que a codigestão elevou a geração de CH₄ em 38 % quando comparado com a monodigestão.

SEEKAO et al., (2021) avaliaram a codigestão do efluente da fabricação de óleo de palma com o glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel em reatores anaeróbios em batelada. Os autores obtiveram elevada geração de CH₄ mediante a proporção de 2 mL glicerol: 40 mL do resíduo. Assim, o efluente da fabricação de óleo de palma correspondeu a um excelente substrato, com uma relação bem equilibrada de C/N, além de conter concentrações suficientes de macro e micronutrientes.

WANG et al., (2021) estudaram a codigestão do glicerol bruto com a fase aquosa de liquefação hidrotérmica de esterco suíno. A liquefação hidrotérmica é um processo termoquímico que converte biomassa úmida em óleo cru, ajudando a eliminar os patógenos e toxinas do substrato, reduzindo seus efeitos negativos no meio ambiente. A fase aquosa de liquefação hidrotérmica correspondeu a um substrato de valor para a codigestão com o glicerol já que continha 35-40 % do carbono e 65-70 % do nitrogênio. Os autores realizaram os experimentos em dois estágios, sendo o 1° para a geração de H₂ na proporção 1:3, fase aquosa de liquefação hidrotérmica de esterco de suíno: glicerol bruto, e no 2° estágio, os efluentes contendo ácidos orgânicos foram utilizados para a geração de CH₄.

Tabela 2.1 - Codigestão do glicerol bruto com outros resíduos.

Substratos	Reator	Inóculo	Condições operacionais	Geração	Referência
Glicerol bruto e efluente da fabricação do óleo de palma	Reator em batelada	Lodo granular do reator de biogás de uma fábrica de óleo de palma,	1 % v/v glicerol bruto, 200 mL efluente da fabricação do óleo de palma, resíduos:inóculo 2:1, 37 °C, pH 7	553,46 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	(PRASERTSAN et al., 2021)
Glicerol bruto e efluente da fabricação do óleo de palma	Reator em batelada	Lodo de digestão anaeróbia	pH 7,0-7,5, 28 °C, 2 mL glicerol: 40 mL efluente da fabricação do óleo de palma	211,9 mL CH ₄ g ⁻¹ DQO	(SEEKAO et al., 2021)
Glicerol bruto e fase aquosa de liquefação hidrotérmica de esterco de suíno	Reator em batelada	Lodo de tratamento anaeróbio de efluente sintético	1° estágio: pH 5,5, 37 °C, 1:3 (fase aquosa de liquefação hidrotérmica de esterco de suíno:glicerol bruto) de um total de 10 g DQO L ⁻¹ , 30 mL de inóculo pré-tratado. 2° estágio: efluente do 1° estágio, 30 mL de inóculo <i>in natura</i>	1° estágio: 30 mL H ₂ g ⁻¹ DQO 2° estágio: 298 mL CH ₄ g ⁻¹ DQO	(WANG et al., 2021b)
Glicerol bruto e lixiviado de estação de tratamento de resíduos sólidos urbanos	Reator UASB	Lodo granular anaeróbio de estação de tratamento águas residuárias de frutas e vegetais	4kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ , 37 °C, lixiviado:glicerol (60:40 v/v) em 2L de volume total, TDH = 12,5 dias	1369,8 ± 149,2 mL CH ₄ dia ⁻¹	(BERNAT et al., 2021)
Glicerol bruto e água residuária do processamento da mandioca	Biodigestores	Inóculo de águas residuárias da suinocultura	0,24 L volume total (4 % glicerol e 96 % de água residuária do processamento da mandioca), 38,5 °C, pH 5-6, TDH = 90 horas	1102,6 mL ou 861,4 mL H ₂ L ⁻¹ ¹ resíduo	(MEIER et al., 2020)

BERNAT et al., (2021) avaliaram o efeito da codigestão do glicerol bruto proveniente de óleos animais com o lixiviado de estação de tratamento de resíduos sólidos urbanos, rico em nitrogênio, em um reator UASB (2 L), na presença do lodo granular anaeróbico de estação de tratamento águas residuárias de frutas e vegetais com carga de $4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, a 37°C , na proporção de 60 lixiviado: 40 glicerol (v/v) em um TDH (tempo de detenção hidráulica) de 12,5 dias. A produção máxima atingida foi de $1369,8 \pm 149,2 \text{ mL CH}_4 \text{ dia}^{-1}$. Os autores concluíram que o lixiviado foi um excelente substrato para a codigestão com glicerol bruto, sendo possível atingir 97 % de DQO.

MEIER et al., (2020) avaliaram a codigestão do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos com a água residuária do processamento da mandioca, rica em nitrogênio e fósforo para incrementos na geração de H_2 . Com a adição de 4 % de glicerol bruto ao biodigestor de 0,24 L (volume total) contendo 0,23 L de água residuária da mandioca, gerando $1102,6 \text{ mL H}_2$ ($861,4 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1}_{\text{resíduo}}$), representando um aumento de 400 % na geração de H_2 para o ensaio na ausência de glicerol.

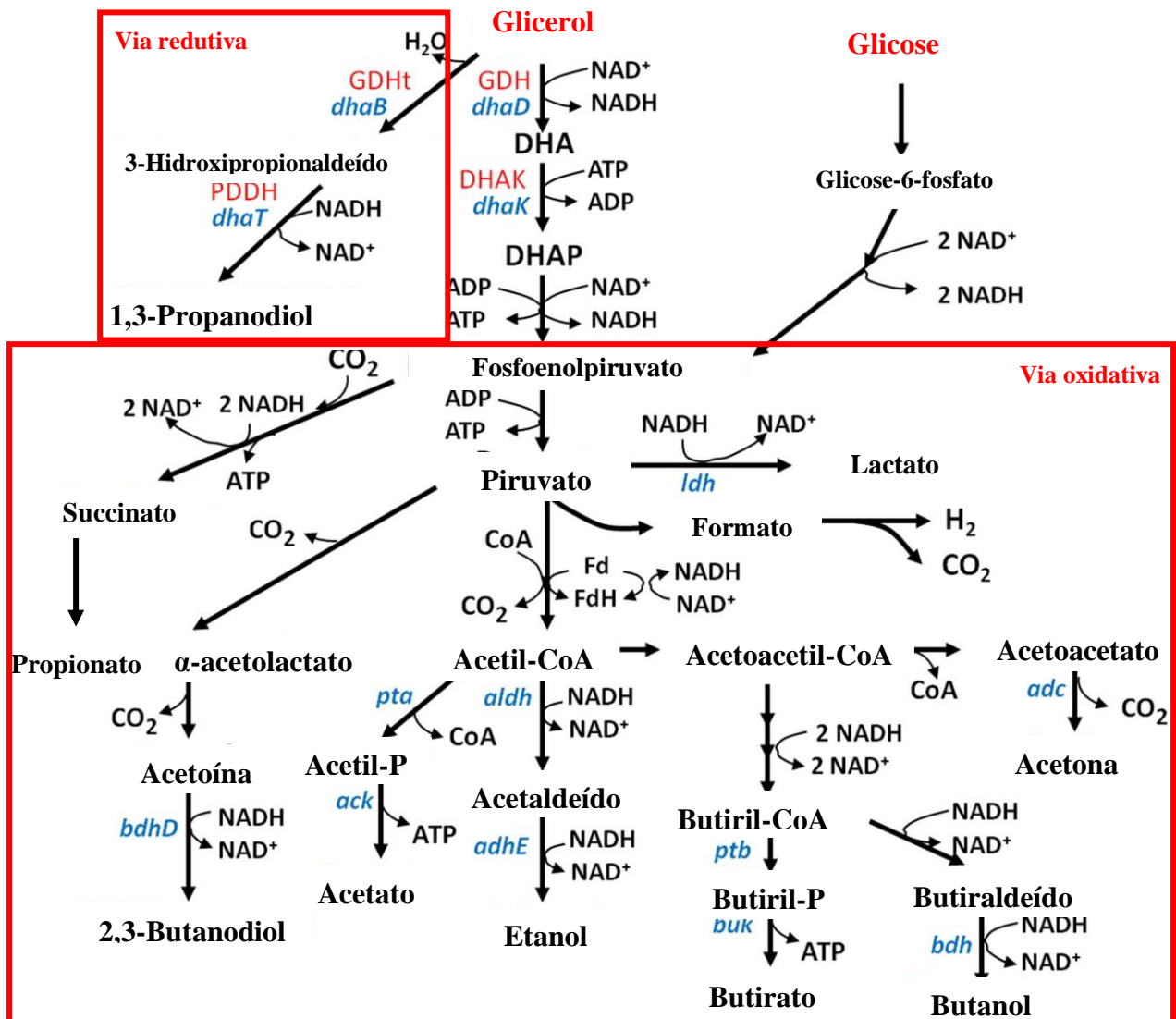
2.6 Bioconversão do glicerol e glicose

O metabolismo do glicerol pode ser dado por meio de duas rotas, a oxidativa e a redutiva, conhecida para alguns gêneros produtores de H_2 como a *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter* (JIN; LEE; MALLOY, 2021). Na via oxidativa (Figura 2.3), o glicerol é primeiramente convertido a dihidroxiacetona (DHA), reação esta catalisada pela enzima glicerol desidrogenase (GDH), com a geração de equivalentes redutores (NADH). A DHA é fosforilada pela enzima glicolítica dihidroxiacetona quinase (DHAK). Então, o produto fosforilado é metabolizado através da glicólise (SARMA et al., 2012). A via redutiva usa glicerol desidratase (GDHt) e 1,3-PD desidrogenase (PDDH) para a produção de 1,3-PD com poder redutor (NADH) gerado na via oxidativa, que usa GDH e DHAK para produzir fosfoenolpiruvato e NADH. Fosfoenolpiruvato é então convertido em piruvato e, em seguida, em vários ácidos orgânicos (principalmente acético, butírico e láctico) e álcoois (2,3-butanodiol, etanol, butanol) e H_2 e CO_2 , dependendo da espécie e das condições de crescimento (WISCHRAL et al., 2016). As duas vias compreendem em um processo funcionalmente importante para equilibrar o carbono intracelular, ao mesmo tempo que fornece energia e pequenas moléculas para o crescimento celular (WANG et al., 2021a).

Durante a codigestão, a glicose geralmente é removida nas primeiras horas gerando os ácidos e álcoois, onde o fluxo de NADH passa a ser utilizado para a via metabólica do glicerol.

Segundo alguns autores como PINTO; PASTERIS; SAAD (2004); VIVEK et al., (2017) e APIWATANAPIWAT et al., (2018), o que irá diferenciar quais vias serão adotadas e quais produtos serão gerados na codigestão caberá à comunidade microbiana que direcionará os fluxos de NADH para a formação dos produtos, dependendo das necessidades dos microrganismos ali presentes, além das concentrações de cada substrato.

Figura 2.3 - Vias metabólicas para a codigestão glicerol e glicose em *Clostridium*.



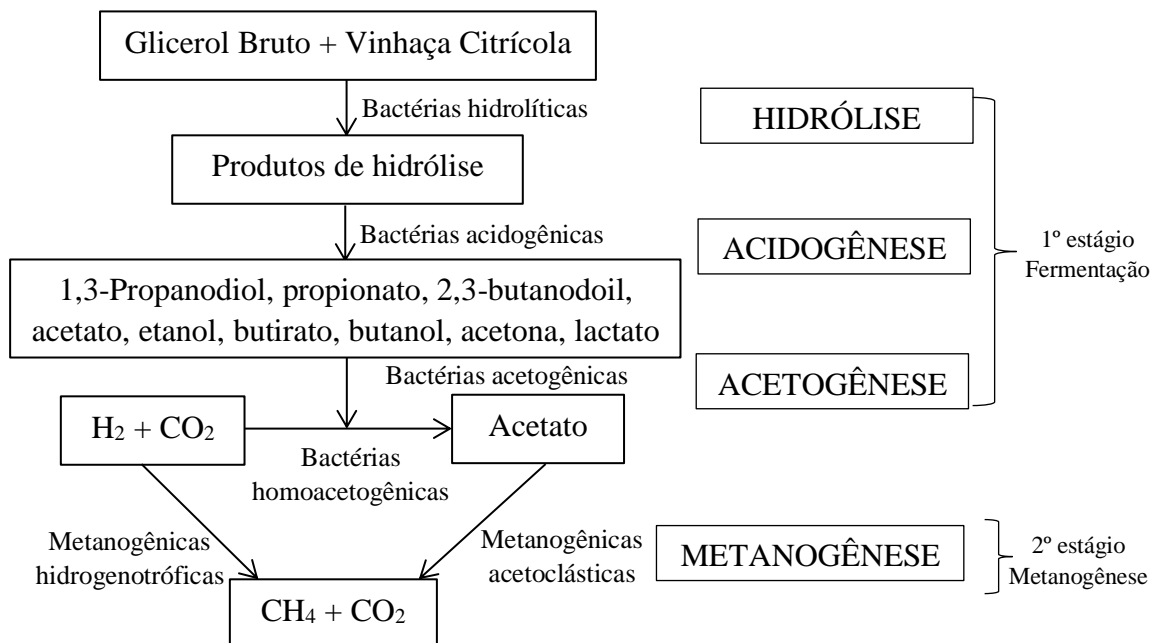
DHA: dihidroxiacetona; DHAK: dihidroxiacetona quinase; DHAP: dihidroxiacetona-P; GDH: glicerol desidrogenase; GDHt: glicerol desidratase; PDDH: 1,3-PD desidrogenase; ack: acetato quinase; adc: álcool descarboxilase; adhE: álcool desidrogenase; aldH: aldeído desidrogenase; bdh: butanol desidrogenase; bdhD: 2,3-butanodiol desidrogenase; buk: butirato quinase; dhaB: glicerol desidratase; dhaD: glicerol desidrogenase; dhaK: dihidroxiacetona quinase; dhaT: 1,3-PD desidrogenase; ldh: lactato desidrogenase; pta: fosfotransacetilase; ptb: fosfotransbutirilase.

Fonte: Adaptado de WISCHRAL et al., (2016)

2.7 Digestão anaeróbia em dois estágios sequenciais

A digestão anaeróbia de resíduos como glicerol bruto e a vinhaça citrícola, envolve uma série de etapas biológicas, em estágios distintos a saber, hidrólise, acidogênese, acetogênese e, finalmente, metanogênese. A hidrólise inicialmente desintegra e solubiliza proteínas, carboidratos e lipídios, advindos destes resíduos orgânicos, em compostos mais simples por reação enzimática microbiana. As próximas duas etapas são então realizadas por microrganismos quimiorrganotróficos, que obtém energia por fermentação utilizando aminoácidos, sacarose, glicose, glicerol ou ácidos graxos voláteis como doadores de elétrons. Microrganismos metanogênicos utilizam ácido acético, metanol, 1,3 propanodiol, etanol, butirato, acetona, lactato e H_2 como o principal doador de elétrons para a produção de CH_4 e CO_2 , degradando, dessa forma, tais resíduos orgânicos a biogás (MASPOLIM et al., 2015) (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na codigestão anaeróbia do glicerol bruto e vinhaça citrícola.



Fonte: Adaptado de SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO (2014)

O H_2 é um importante intermediário na degradação anaeróbia da matéria orgânica. Este, por sua vez, corresponde a um combustível atraente devido ao seu alto conteúdo energético ($141,9 \text{ MJ kg}^{-1}$) quando comparado ao diesel (45 MJ kg^{-1}), à gasolina (47 MJ kg^{-1}) e ao CH_4

(50,02 MJ kg⁻¹), por exemplo (SETA et al., 2018). Além disso, a produção de H₂ pode ser considerada uma futura fonte de energia limpa, pois gera apenas água durante a combustão (RODRIGUES et al., 2020b). Portanto, a fim de possibilitar a obtenção de um elevado rendimento de H₂ é necessário interromper o processo de digestão anaeróbia na fase acidogênica. Para conseguir isso, condições de operação favoráveis para bactérias acidogênicas devem ser estabelecidas enquanto a atividade de microrganismos consumidores de H₂ (arqueias metanogênicas e bactérias homoacetogênicas) deve ser evitada. No entanto, durante a fermentação de resíduos orgânicos, normalmente apenas 10-20 % da energia contida no substrato é convertida em produtos gasosos como H₂ e CO₂, enquanto 80-90 % da DQO permanece na fase líquida como produtos metabólicos solúveis, incluindo ácidos graxos voláteis e etanol (SILVA et al., 2018).

A obtenção de CH₄ em um único estágio pode causar o acúmulo de ácidos graxos voláteis, o que diminuiria o pH, trazendo riscos para o gerenciamento da estabilidade do reator (ALGAPANI et al., 2018; LOVATO et al., 2020). Microrganismos geradores de ácidos e arqueias produtoras de CH₄ são bastante diferentes em termos de fisiologia, necessidades nutricionais, cinética de crescimento e sensibilidade às condições ambientais. Portanto, a divisão do processo de digestão anaeróbia em dois reatores (acidogênico e metanogênico) alivia esses problemas durante a geração de CH₄ e ajudaria no controle da conversão de ácidos graxos voláteis pelos microrganismos acetogênicos e metanogênicos (LOVATO et al., 2020).

A execução da digestão anaeróbia em dois estágios sequenciais proporciona a seleção e enriquecimento de consórcios microbianos específicos e diferentes em cada estágio, resultando em uma melhor estabilidade geral do processo. No 1º estágio, pH reduzido e tempos curtos de operação são mantidos para favorecer a fermentação da matéria orgânica em H₂, ácidos graxos voláteis e álcoois. As bactérias produtoras de H₂ são menos sensíveis às flutuações do pH do que as arqueias metanogênicas. No 2º estágio, pH neutro e tempos de operação mais longos são mantidos para desenvolver o crescimento de microrganismos metanogênicos para posterior conversão de acetato em CH₄ e CO₂. Estes microrganismos são muito sensíveis a mudanças de pH, acúmulo de ácidos graxos voláteis, álcoois e taxas de carregamento orgânico (MONLAU et al., 2015). Dessa forma, o 2º estágio acaba sendo uma etapa de tratamento do meio líquido gerado durante a etapa acidogênica, onde, combinado com o estágio de produção de H₂, otimiza o uso da matéria orgânica restante e, portanto, aumenta a recuperação de energia (SILVA et al., 2018).

DE GIOANNIS et al., (2017) operaram reatores de tanque agitado em batelada para digestão anaeróbia em um e dois estágios sequenciais contendo resíduos alimentares, visando

a recuperação CH_4 e $\text{H}_2 + \text{CH}_4$, respectivamente. Os resultados obtidos pelos autores sugeriram que o processo em dois estágios, com a geração adicional de H_2 , exibiu um rendimento 20 % superior do que um único estágio. A maior geração de CH_4 no segundo estágio foi devido à melhor hidrólise e fermentação dos resíduos alimentares no primeiro estágio, com maiores quantidades de ácidos graxos voláteis e álcoois prontamente disponíveis para a metanogênese (DE GIOANNIS et al., 2017).

FU et al., (2017) relataram o aumento na geração de CH_4 operando reatores em batelada para a digestão anaeróbia da vinhaça. O rendimento de CH_4 da digestão anaeróbia de dois estágios foi 10,8 % superior ao estágio único.

BALDI; PECORINI; IANNELLI, (2019) verificaram que a codigestão em dois estágios sequenciais de resíduos alimentares e lodo ativado foi mais eficiente ao processo tradicional em estágio único. Os resultados mostraram um aumento na produção de biogás e remoção de sólidos voláteis de 26% e 9%, respectivamente.

NGUYEN et al., (2021) investigaram o desempenho da recuperação de recursos do sistema piloto de digestão anaeróbia de dois estágios sequenciais, em termos de recuperação de carbono por meio da produção de biogás e recuperação de nutrientes. Os autores utilizaram resíduos alimentares coletados diariamente em residências e restaurantes. Os autores concluíram que uma planta de digestão anaeróbia em dois estágios sequenciais com capacidade de 5200 toneladas dia^{-1} destes resíduos poderia gerar eletricidade diária de 552 MWh, energia térmica de 630 MWh e recuperação de 16,1 toneladas de NH_4^+ . Segundo os autores, o rendimento de produção de biogás da planta piloto foi superior ao processo em estágio único em comparação aos outros trabalhos na literatura.

2.8 Metabólitos secundários de valor agregado

Além do H_2 gerado no primeiro estágio, outros metabólitos também podem ser obtidos em elevadas concentrações, como o 1,3-PD, ácido propiônico e ácido lático, por exemplo. O 1,3-PD possui diversas aplicações nas indústrias têxtil, cosmética, de limpeza, fragrâncias, resinas, cuidados pessoais, entre outras. Ele pode ser usado como um monômero para produzir tereftalato de polítrimetileno (PTT), poliuretano e poliésteres. Prevê-se que o mercado global de 1,3-PD cresça de R\$ 2.800 milhões em 2019 para R\$ 4.900 milhões em 2024 (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020). A demanda do mercado mundial por este produto foi de 1,46 milhões de toneladas em 2014, prevendo-se até 2022 uma produção de 2,25 milhões de toneladas (FOKUM et al., 2021). O crescimento do mercado de 1,3-PD é impulsionado pelo aumento da

demanda por PTT. No passado, 1,3-PD era produzido a partir de acroleína ou óxido de etileno por meio de processos químicos. No entanto, esses métodos apresentam várias desvantagens, incluindo seus elevados custos e a necessidade de operar sob altas pressões (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020). Recentemente, a natureza econômica e ecologicamente correta da biossíntese microbiana de 1,3-PD tornou esta abordagem mais viável e preferível à síntese química, que necessita de catalisadores caros e leva a intermediários tóxicos (FOKUM et al., 2021).

Muitos microrganismos, incluindo os gêneros *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter* e *Enterobacter* têm sido amplamente utilizados para a produção de 1,3-PD a partir do glicerol (YUN et al., 2021). FOKUM et al., (2021) utilizaram *C. beijerinckii* CCIC 22954 para a geração deste metabólito, tendo sua produção aumentada em 37 % a partir da codigestão de glicerol bruto e glicose quando comparado à monodigestão com apenas o glicerol bruto. SEDLAR et al., (2021) obtiveram elevados rendimentos de 1,3-PD utilizando *Clostridium diolis* DSM 15410 a partir de glicerol. Já o trabalho de KONGJAN et al., (2021) avaliaram a geração de 1,3-PD utilizando *Enterobacter* sp. MU-01 a partir da remoção do glicerol bruto. Apesar do extenso uso de culturas puras para a geração deste metabólito, culturas mistas ganham destaque por corresponderem à processos de custo reduzido, sendo fáceis de implementar, acarretando na redução de problemas com contaminações (RODRIGUES et al., 2019b). XAFENIAS; ANUNOBI; MAPELLI, (2015) e RODRIGUES et al., (2019a) correspondem a um dos poucos autores que fizeram o uso de culturas mistas para a geração de 1,3-PD.

O ácido propiônico é um importante intermediário químico usado na síntese de vitamina E, sabores artificiais de frutas, fragrâncias e perfumes. Seus sais são amplamente utilizados como conservantes de alimentos e rações. Atualmente, quase todo ácido propiônico industrial é produzido por meio de síntese química à base de petróleo, com capacidade de produção anual de aproximadamente 180.000 mil toneladas nos Estados Unidos. Com os preços do petróleo bruto ultrapassando R\$ 566 o barril, além das preocupações com a sustentabilidade, foram gerados interesses na produção de ácido propiônico a partir da fermentação de fontes renováveis de carbono (WANG; YANG, 2013; ZHANG et al., 2015).

WANG; YANG, (2013) realizaram a codigestão do glicerol bruto com hidrolisado do bagaço da mandioca em biorreatores em batelada, utilizando a cultura pura *Propionibacterium freudenreichii*, proporcionando uma forma eficiente de produção econômica de ácido propiônico de base biológica. PARANHOS; SILVA, (2020) otimizaram a geração concomitante de H₂, 1,3-PD e ácido propiônico com o uso de lodo granular do reator UASB

mesofílico do tratamento de águas residuárias do abatedouro de aves, a partir da remoção do glicerol bruto, utilizando um reator anaeróbio de leite fluidizado.

O ácido láctico corresponde a um ácido orgânico natural, com aplicações amplas nos campos da indústria alimentícia, cosmética, têxtil e farmacêutica. É atualmente considerado um dos monômeros com maior potencial, que pode ser convertido em produtos químicos como ácido pirúvico, ácido acrílico, 1,2-propanodiol, 2,3-pentanodiona, ésteres de lactato e ácido polilático, sendo este último biodegradável utilizado em aplicações médicas, de embalagens e eletrônicas. O ácido láctico é considerado um dos ácidos hidroxicarboxílicos mais importantes, sendo que seu mercado global em 2020 atingiu R\$ 21 bilhões, com uma taxa de crescimento anual de 18,6 %. Este ácido pode ser produzido por síntese química ou pela fermentação dos carboidratos presentes na biomassa. Hoje, o ácido láctico é produzido comercialmente principalmente através da fermentação de açúcares, incluindo glicose e sacarose derivada de matérias-primas amiláceas (KUPILA et al., 2021; ZHAO et al., 2021).

WILKENS et al., (2012) relataram uma alteração na geração de ácidos orgânicos voláteis a partir da fermentação do glicerol bruto proveniente do óleo de colza na presença de *Clostridium butyricum*. Quando o glicerol bruto foi utilizado, a concentração de ácido butírico diminuiu em torno de 38 %, enquanto a geração de ácido láctico aumentou de 1 g L^{-1} para 6 g L^{-1} em comparação com o uso de glicerol puro, sendo possível prever que as impurezas do glicerol bruto foram responsáveis pelo desvio na rota metabólica para a geração de ácido láctico.

METSOVITI et al., (2013) observaram que as concentrações elevadas de glicerol bruto impediram significativamente a geração de 1,3-PD. Por outro lado, a geração de ácido láctico aumentou gradativamente conforme as adições de glicerol bruto ao meio de cultivo.

MAINA et al., (2019) salientaram que diferentes tipos de glicerol bruto levaram à geração de diferentes concentrações de ácido láctico. Quando *Citrobacter freundii* VK-19 foi cultivado em glicerol puro, os principais metabólitos gerados foram ácido láctico ($9,7 \text{ g L}^{-1}$), ácido acético ($7,6 \text{ g L}^{-1}$) e ácido fórmico ($6,8 \text{ g L}^{-1}$). Quando a mesma cepa foi cultivada em glicerol bruto, a concentração de ácido láctico aumentou para $20,8 \text{ g L}^{-1}$ e as concentrações de ácido acético e fórmico diminuíram (MAINA et al., 2019).

ICHINOSE et al., (2020) avaliaram a codigestão do glicerol bruto com a glicose na geração de ácido láctico na presença de *Lactobacillus reuteri* JCM1112. Os autores observaram que a bactéria produziu lactato com um rendimento de $4,7 \pm 0,8 \text{ g} \cdot \text{g-célula}^{-1}$ usando glicose como única fonte de carbono. Em contrapartida, a adição de glicerol à glicose em uma razão molar glicerol/glicose (3:1), a bactéria produziu 1,3-PD a $1,6 \pm 0,7 \text{ g} \cdot \text{g-célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e o rendimento de lactato diminuiu a $3,6 \pm 0,5 \text{ g} \cdot \text{g-célula}^{-1}$. Assim, os autores concluíram que o

uso do glicerol suprimiu a atividade do *Lactobacillus reuteri* JCM1112, reduzindo a geração do ácido láctico devido à competição por NADH, desviando a rota para a geração de 1,3-PD.

Assim, fica evidente que as concentrações dos principais metabólitos gerados no primeiro estágio (H₂, 1,3-PD, ácido propiônico e ácido láctico), bem como as rotas metabólicas adotadas em biosistemas integrados durante a codigestão do glicerol bruto com resíduos contendo glicose, dependerão principalmente do tipo de inóculo envolvido no processo e da concentração de glicerol bruto, conforme relatado por meio dos trabalhos encontrados na literatura.

2.9 Estudo da diversidade microbiana

Em se tratando de culturas mistas, diversas ferramentas são adotadas para a investigação da composição microbiana. O conhecimento da comunidade composta por microrganismos provenientes de sistemas biológicos a partir de ferramentas como a biologia molecular permite conhecer a riqueza taxonômica (composição de espécies) responsável pela geração dos metabólitos de interesse (MONTROYA, 2019).

Com o objetivo de estudar o domínio Bactéria, o gene alvo da análise de biologia molecular corresponde ao gene RNA (ácido ribonucleico) ribossômico 16S e os genes da região espaçadora transcrita interna (ITS) do RNAr (RNA ribossômico) nuclear para o domínio Eucariota. Em relação à análise metagenômica para se determinar o genoma completo dos microrganismos, é aplicado o sequenciamento em larga escala através de bilhões de fragmentos de DNA (MONTROYA, 2019).

A tecnologia de sequenciamento de alto rendimento apresenta vantagens na eficiência de detecção, custo e precisão das informações. Sendo assim, a plataforma Illumina Miseq preenche estes requisitos, apresentando baixo custo de sequenciamento, alta precisão de dados e ciclo experimental curto (CHEN et al., 2021b).

SILVA-ILLANES et al., (2017) investigaram a comunidade microbiana envolvida na fermentação de glicerol bruto em reatores contínuos para a geração de H₂, sendo identificados microrganismos pertencentes à espécie *Clostridium* sp. em elevada abundância relativa. BADIA-FABREGAT et al., (2019) analisaram a comunidade microbiana envolvida na produção bioeletroquímica de H₂ a partir de glicerol bruto como única fonte de carbono. O sequenciamento Illumina MiSeq foi usado com sucesso na investigação da diversidade microbiana de produtos vegetais chineses fermentados por suas aplicações rápidas, precisas, eficientes e baratas (LIN et al., 2020).

RODRIGUES et al., (2020b) avaliaram a comunidade microbiana de reatores anaeróbios em batelada sequenciais para a geração de H₂ a partir do consumo de glicerol bruto em sistemas fermentativos e foto-fermentativos utilizando a plataforma Illumina MiSeq e verificaram abundância relativa das espécies *Clostridium* sp. e *Bosea* sp., respectivamente.

2.10 Justificativa do presente estudo

A cofermentação do glicerol bruto e vinhaça citrícola representa uma alternativa atraente para a redução concomitante destes resíduos, bem como a geração de produtos com valor agregado como o 1,3-PD, ácido propiônico, ácido lático, além do biogás H₂ e CH₄. Assim, associar a codigestão do glicerol em resíduos ricos em glicose com o uso de culturas mistas podem melhorar a geração de metabólitos secundários, bem como elevar a geração de bioenergia, conforme será abordado no presente estudo. Além disso, a adição do esgoto sanitário poderá suprir as necessidades de nitrogênio e fósforo que auxiliarão na digestão anaeróbia do glicerol bruto.

Dessa forma, o conhecimento da comunidade microbiana por meio das ferramentas de análise de biologia molecular fornece dados complementares aos processos anaeróbios. A investigação detalhada da composição dos microrganismos presentes em reatores direciona a uma maior compreensão dos elementos envolvidos na geração dos metabólitos obtidos ao final dos ensaios.

Sendo assim, o presente trabalho se apresentou inédito do ponto de vista da utilização de vinhaça citrícola como fonte de glicose sendo codigerida com diferentes tipos de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir de diversas fontes de triglicerídeos, a saber: óleos residuais domésticos e gordura animal, em biosistemas integrados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Hipótese geral: Glicerol bruto codigerido com vinhaça citrícola e esgoto sanitário são excelentes substratos para a geração de metabólitos secundários de valor agregado e biogás.

Objetivo geral: Remover glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir da codigestão com vinhaça citrícola e em alguns casos, o esgoto sanitário, e obter produtos de valor agregado como ácidos graxos voláteis (ácido propiônico e ácido láctico), álcoois (1,3-PD) além de vetores energéticos como H_2 e CH_4 .

Hipótese 1: Diferentes inóculos podem ser usados para a remoção do glicerol na codigestão anaeróbia.

Objetivo 1: Comparar a remoção do glicerol bruto mediante o uso de dois inóculos de fontes distintas (I) e (II) durante a codigestão anaeróbia com vinhaça citrícola em biosistemas integrados em reatores de escala laboratorial.

Hipótese 2: Lodos granulares anaeróbios são compostos por microrganismos produtores e consumidores de H_2 .

Objetivo 2: Buscar o melhor pré-tratamento no inóculo II na inibição de microrganismos consumidores de H_2 que será ser usado no biosistema fermentativo.

Hipótese 3: A codigestão do glicerol bruto com vinhaça citrícola promoverá a maior remoção do glicerol além de produções mais elevadas de 1,3-PD, ácido láctico, bem como vetores energéticos como H_2 e CH_4 .

Objetivo 3: Avaliar a melhor proporção dos resíduos glicerol bruto e vinhaça citrícola em biosistemas integrados (fermentação seguida da metanogênese) visando remoções de tais resíduos agroindustriais, com obtenções de 1,3-PD, ácido láctico, H_2 e CH_4 .

Hipótese 4: Diferentes inóculos em diferentes concentrações de resíduos levam à alterações na rota metabólica e geração de diferentes produtos.

Objetivo 4: Identificar o inóculo responsável pela geração mais elevada de H_2 e remoção de glicerol bruto, codigerido com vinhaça citrícola, durante a operação de reatores em condições otimizadas, visando rendimentos elevados na geração deste biogás.

Hipótese 5: Reatores em escala ampliada codigeridos com vinhaça citrícola e esgoto sanitário podem aumentar a remoção de glicerol e gerar elevadas produções de biogás.

Objetivo 5: Avaliar a remoção do glicerol bruto codigerido com vinhaça citrícola e esgoto sanitário, em diferentes proporções, visando à geração de CH₄.

Hipótese 6: A comunidade microbiana sofre alterações em função das condições operacionais aplicadas nos reatores anaeróbios alimentados com glicerol bruto, vinhaça citrícola e esgoto sanitário.

Objetivo 6: Identificar as alterações na composição da comunidade microbiana presente nos ensaios fermentativos e metanogênicos, tanto nos biossistemas integrados quanto no biossistema único em escala ampliada.

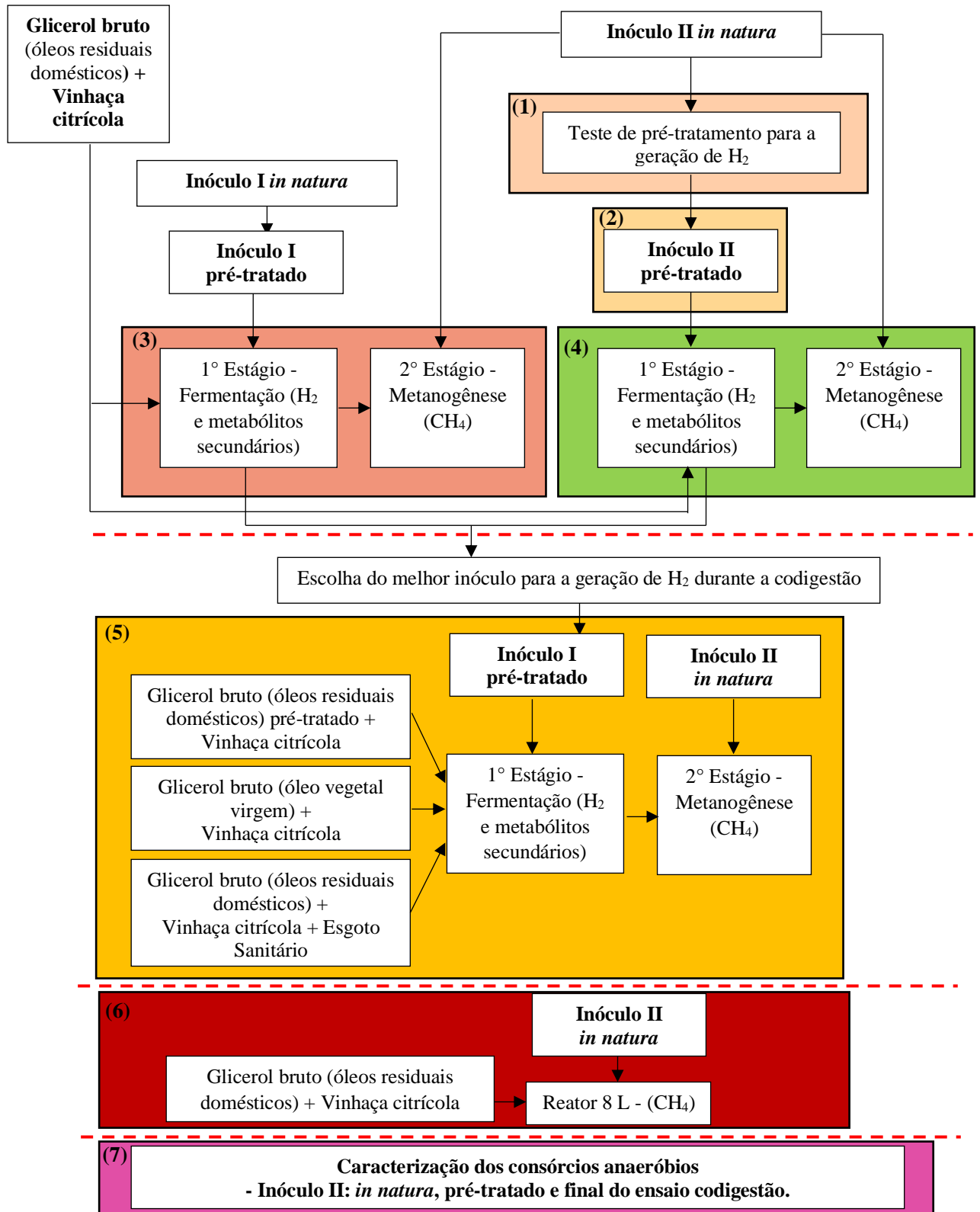
4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em 7 etapas, utilizando dois inóculos distintos; I e II (apresentados na seção 4.2). As atividades realizadas em cada etapa foram as seguintes:

- (1) testes de pré-tratamento no inóculo II para a geração de H₂;
- (2) enriquecimento do inóculo II pré-tratado;
- (3) montagem dos ensaios de codigestão anaeróbia com o inóculo I em diferentes concentrações de glicerol bruto e vinhaça citrícola, em dois estágios sequenciais;
- (4) montagem dos ensaios de codigestão anaeróbia com o inóculo II em diferentes concentrações de glicerol bruto e vinhaça citrícola, em dois estágios sequenciais;
- (5) ensaios para cenários distintos com o inóculo de maior potencial de geração de H₂;
- (6) ensaios de codigestão anaeróbia com glicerol bruto, vinhaça citrícola e esgoto sanitário para a geração de CH₄ em escala ampliada (reator de 8 L) e
- (7) caracterização dos consórcios anaeróbios.

O fluxograma experimental está apresentado na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Fluxograma experimental geral



Fonte: Elaboração própria, 2021

4.1 Substratos

Glicerol Bruto advindo de óleos residuais domésticos (GBR): coletado da planta piloto de produção de biodiesel do Instituto de Biotecnologia (Ibiotec) da Uniara, Araraquara – SP. O Biodiesel foi produzido por processo de transesterificação a partir de óleos residuais domésticos, metanol e hidróxido de sódio (catalisador). O glicerol bruto originado foi previamente caracterizado em trabalhos anteriores (RODRIGUES et al., 2016) contendo: 1961,0 g DQO L⁻¹, 10,41 % de teor de glicerol livre, 23,38 % de sabão, 15,84 % de metanol, 22,75 % de umidade e materiais voláteis, 5,84 % de água, 3,04 % de cinzas e 34,57 % de Matéria Orgânica Não Glicerol (MONG), além do pH 10,00.

Glicerol Bruto advindo de óleos residuais domésticos pré-tratado (GBRT): foi aplicado o pré-tratamento ácido, adicionando-se HCl (1,0 M) a fim de que o pH ficasse em torno de 3,0 para que os ácidos graxos livres pudessem ser separados por decantação. Centrifugou-se a 9000 rpm por 8 minutos, onde foram desprezados os ácidos graxos livres formados na parte superior de tubos falcon e recuperado na parte inferior o glicerol bruto pré-tratado (CHI et al., 2007).

Glicerol Bruto advindo de óleos vegetais virgens (GBV): coletado da empresa BIOBROTAS (Brotas – SP), contendo 1173,33 g DQO L⁻¹, 80,63 % de teor de glicerol livre, 8,01 % de sabão, 5,33 % de metanol, 11,41 % de umidade e materiais voláteis, 5,11 % de cinzas e 2,84 % de MONG, além do pH 4,35.

Vinhaça citrícola (VC): proveniente da obtenção do etanol de segunda geração da fermentação de carboidratos da biomassa de indústria citrícola (Matão - SP), contendo principalmente 187,55 g DQO L⁻¹, 41,02 g L⁻¹ de glicose, 62,21 g L⁻¹ de frutose, 8,94 % de sólidos totais solúveis (Brix), 6,00 % de sólidos suspensos e pH 4,07 (TORQUATO et al., 2017).

Esgoto sanitário (ES): coletado da estação de tratamento de esgoto de Rio Claro - SP, mantido a -20 °C até sua utilização e composto de: 4,02 g L⁻¹ de nitrogênio, 70,23 mg L⁻¹ de sólidos totais, 0,59 g DQO L⁻¹, 23,70 mg L⁻¹ de amônio, 1,60 mg L⁻¹ de nitrato, 5,90 mg L⁻¹ de fósforo e pH 6,73.

4.2 Inóculos

Inóculos de origens distintas foram utilizados na montagem dos ensaios no 1º Estágio (fermentação):

Inóculo I: obtido do lodo granular do reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (sigla em inglês UASB para *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) termofílico (55 °C) usado no tratamento de vinhaça a partir da cana de açúcar e etanol da indústria sucroalcooleira (São Martinho, Pradópolis – SP). Este inóculo foi pré-tratado a quente (100 °C, 15 minutos) em trabalhos anteriores e identificado como pertencente predominantemente aos gêneros *Clostridium* e *Enterococcus*, cujas sequências provenientes da identificação biomolecular foram submetidas ao NCBI (National Center for Biotechnology Information-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob número de acesso SAMN05055757 (Fermentative anaerobic bacteria consortia to generate hydrogen), “Sequence Read Archive” (SRA) SRP075454 e número de acesso do projeto PRJNA322194 (RODRIGUES et al., 2019a).

Inóculo II: obtido do lodo granular mesofílico do reator UASB usado no tratamento de água residuária do abatedouro de aves (Avícola Dacar, Tietê – SP). Este foi submetido a vários pré-tratamentos para a inibição dos microrganismos metanogênicos (conteúdo explorado na seção 4.2.2) e caracterizado por técnicas de biologia molecular (seção 4.8.2).

Para a montagem dos ensaios no 2º Estágio (metanogênese) foi utilizado o inóculo II *in natura* e caracterizado por técnicas de biologia molecular (seção 4.8.2).

4.2.1 Inóculo II: Reativação para os reatores fermentativos

O inóculo II foi macerado e transferido, separadamente, para duplicatas de reatores anaeróbios em batelada (2000 mL) contendo 1000 mL de meio de cultivo PYG (Peptone, Yeast Extract e Glucose) (da sigla, em inglês, para peptona, extrato de levedura e glicose) modificado, com a substituição de glicerina P.A. ao invés de glicose P.A. (Tabela 4.1), com o objetivo de favorecer o crescimento das bactérias anaeróbias presentes na amostra. A modificação no meio de cultivo se deveu à adição de glicerina P.A. ao invés de glicose.

Tabela 4.1 - Composição do meio de cultivo PYG modificado.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicerina P.A.	10,0
Extrato de levedura	5,0
Extrato de carne	5,0
Peptona de carne	5,0

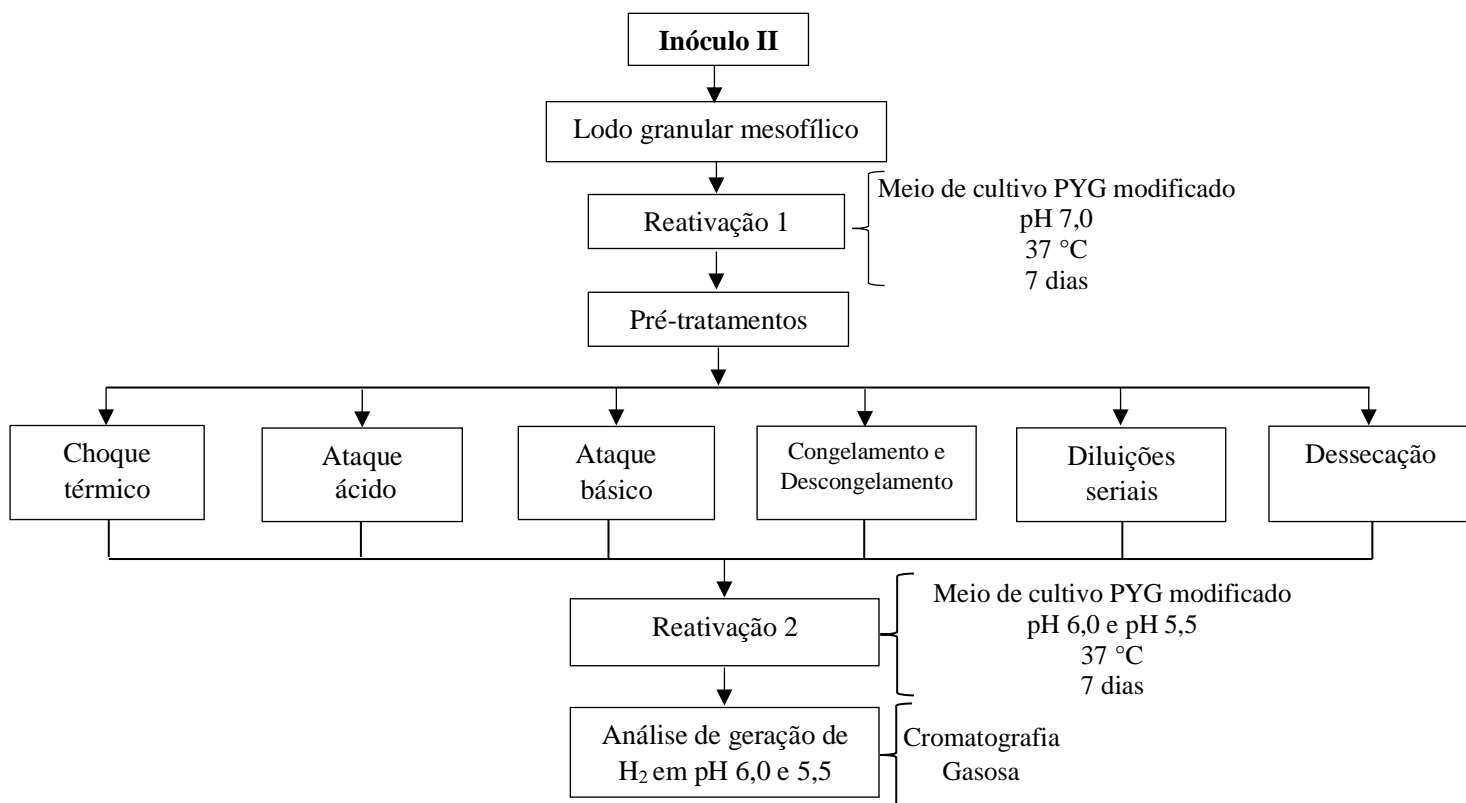
O meio de cultivo foi preparado com a adição dos reagentes sob fluxo de N₂ (100 %) no *headspeace* dos reatores durante 20 minutos para efetuar as trocas gasosas e garantir as

condições de anaerobiose, em pH 7,0 (obtido com adições de 1 M NaOH ou 1 M HCl). O inóculo (15 g STV L⁻¹) foi adicionado, separadamente, aos reatores para a sua reativação e estes foram mantidos a 37 °C, no escuro, em modo estático, por 7 dias. Após a reativação, foram realizados os pré-tratamentos conforme descritos a seguir.

4.2.2 Pré-tratamentos no inóculo II

A fim de representar em linhas gerais o desenvolvimento dos pré-tratamentos aplicados ao inóculo II reativado, um fluxograma está apresentado na Figura 4.2. Os pré-tratamentos apresentados são os seguintes: choque térmico, ataque ácido, ataque básico, congelamento e descongelamento, diluições seriadas e dessecação.

Figura 4.2 – Esquema operacional para os pré-tratamentos do inóculo II.



Fonte: Elaboração própria, 2021

O choque térmico foi realizado mantendo o inóculo a 100 °C durante 15 minutos em uma chapa de aquecimento com posterior imersão em banho de gelo até que a temperatura atingisse 25 °C (MAINTINGUER et al., 2008).

Quanto aos ataques ácido e básico, o inóculo foi mantido, separadamente, em pH 3,0 (adição de HCl 1 M) e em pH 10,0 (adição de NaOH 1 M), respectivamente, pelo período de 24 horas (ROSSI et al., 2011; YANG et al., 2018).

O congelamento e descongelamento foram realizados pela exposição do inóculo à 20 °C durante 24 horas e após esse período, o mesmo foi descongelado à temperatura ambiente (ROSSI et al., 2011).

As diluições seriais foram realizadas de duas maneiras. Para a primeira, 20 % (v/v) do inóculo (10 mL) foi adicionado a um frasco de 100 mL, contendo 50 mL de meio PYG, em pH 7,0. Imediatamente a esta adição, uma nova alíquota deste meio (10 mL) foi retirada e adicionada a um novo frasco contendo um novo meio. Esse procedimento foi realizado repetidas vezes até à diluição 10^{-10} . Na segunda, 20 % (v/v) do inóculo (50 mL) foi adicionado a um frasco Duran® de 500 mL, contendo 250 mL de meio PYG, em pH 7,0. O mesmo foi mantido em estufa a 37 °C pelo período de 24 horas. Após este tempo, uma alíquota deste meio (20 % v/v), contendo o inóculo, foi retirada e adicionada a um novo meio sob as mesmas condições do anterior. Este procedimento foi realizado por mais 3 vezes.

Na dessecação, o inóculo foi mantido a 100 °C por 12 horas, em estufa. Após o processo de secagem, a biomassa foi macerada em almofariz e armazenada em geladeira, em frascos tampados e na ausência de luz (SIQUEIRA; REGINATTO, 2015).

Os inóculos pré-tratados foram adicionados, separadamente, em frascos de 100 mL, contendo 50 mL de um novo meio PYG (Reativação 2), em anaerobiose (fluxo de N₂ no *headspace*) em faixas distintas de pH, 6,0 e 5,5, para a avaliação da eficiência do pré-tratamento na melhor condição para produção de H₂. Os frascos foram mantidos em estufa a 37 °C durante 7 dias. A fase gasosa dos reatores foi coletada e analisada por cromatografia gasosa.

Para a interpretação e análise dos resultados foi utilizado ANOVA (Análise de Variância) com correções para a heterogeneidade de variâncias (Welch) seguido de comparações múltiplas (Games-Howell) a fim de ser comprovada a diferença estatística entre a produção de H₂ por meio do ataque ácido, básico e choque térmico. O nível de significância adotado foi de 5 %.

4.2.3 Enriquecimento do inóculo II pré-tratado

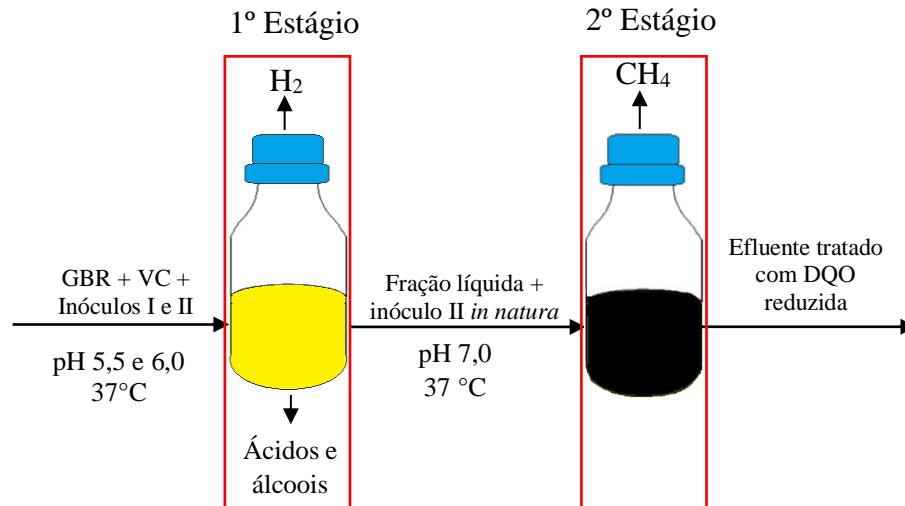
Alíquota do inóculo (0,75 g STV L⁻¹) proveniente do pré-tratamento ácido foi incubada em reatores anaeróbios em batelada (50 mL) contendo 25 mL do meio de cultivo em meio PYG modificado (Tabela 4.1) e 25 mL de *headspace* (N₂ 100 %), na melhor condição para a geração

de H_2 (pH 6,0) e mantidos a $37\text{ }^\circ\text{C}$, sob modo estático, até o crescimento das culturas durante 72 horas (RODRIGUES et al., 2016).

4.3 Reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais: fermentação e metanogênese

Os reatores anaeróbios em batelada foram montados em dois estágios sequenciais, sendo a fermentação (1º estágio) seguida da metanogênese (2º estágio), conforme representado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Representação geral dos reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais.



Fonte: Elaboração própria, 2021

Alíquotas (20 % em relação ao volume do meio líquido) dos inóculos ($0,15\text{ g STV L}^{-1}$) I e II foram incubadas, separadamente, em reatores anaeróbios em batelada (1000 mL) contendo 650 mL do meio de cultivo PYG modificado (Tabela 4.1) e 350 mL de *headspace* (N_2 100 %), em pH 5,5 para o inóculo I e em pH 6,0 para o inóculo II e mantidas sob modo estático a $37\text{ }^\circ\text{C}$ até o crescimento das culturas, 72 horas anteriormente à montagem de cada ensaio fermentativo.

Após esse período, os inóculos reativados foram ressuspensos em centrífuga, a 9000 rpm, por 10 minutos e utilizados como biomassa na montagem dos ensaios em dois estágios sequenciais.

4.3.1 Avaliação da codigestão do GBR em VC

Para o 1º estágio, os reatores anaeróbios em batelada (500 mL) foram operados em duplicata para cinco condições distintas 1, 2, 3, 4 e 5, variando-se as concentrações de GBR e VC, com o inóculo I, conforme apresentado na Figura 4.4. Assim, para cada condição, um reator controle contendo somente GBR como fonte de carbono foi montado a fim de ser feito um comparativo com os ensaios de codigestão. Todos os reatores foram alimentados com meio PYG modificado (Tabela 4.1), sendo o volume líquido total de 400 mL, *headspace* (100 mL) preenchido com N₂ (100 %), 0,12 STV (g L⁻¹) de inóculo, pH inicial 5,5 e mantidos a 37 °C, sob modo estático. Os ensaios 6, 7, 8 e 9 foram operados sob as mesmas condições que os ensaios 1, 2, 3 e 4, respectivamente, substituindo-se o inóculo I pelo inóculo II e o pH inicial de 5,5 para 6,0 (Figura 4.5).

O meio líquido foi separado dos inóculos a 9000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos. Esta fração líquida (200 mL) do 1º estágio foi utilizada como substrato para os reatores anaeróbios em batelada (500 mL) no 2º estágio. O pH foi ajustado para 7,0 e foi adicionado 20 % (v/v) (1,5 g STV L⁻¹) do inóculo II *in natura*. O *headspace* (300 mL) foi preenchido com N₂ (100 %). Os reatores foram mantidos a 37 °C até a estabilização da geração de CH₄, sob modo estático (Figura 4.4 e 4.5).

Todos os ensaios foram monitorados com amostras líquidas coletadas ao final de cada estágio a fim de serem quantificados os metabólitos secundários, glicerol, açúcares, DQO e pH. O biogás produzido (CH₄ e H₂) foi determinado por deslocamento de volume e adaptado de AQUINO et al., (2007), apresentado na seção 4.6.

Figura 4.4 - Codigestão do GBR em VC em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.

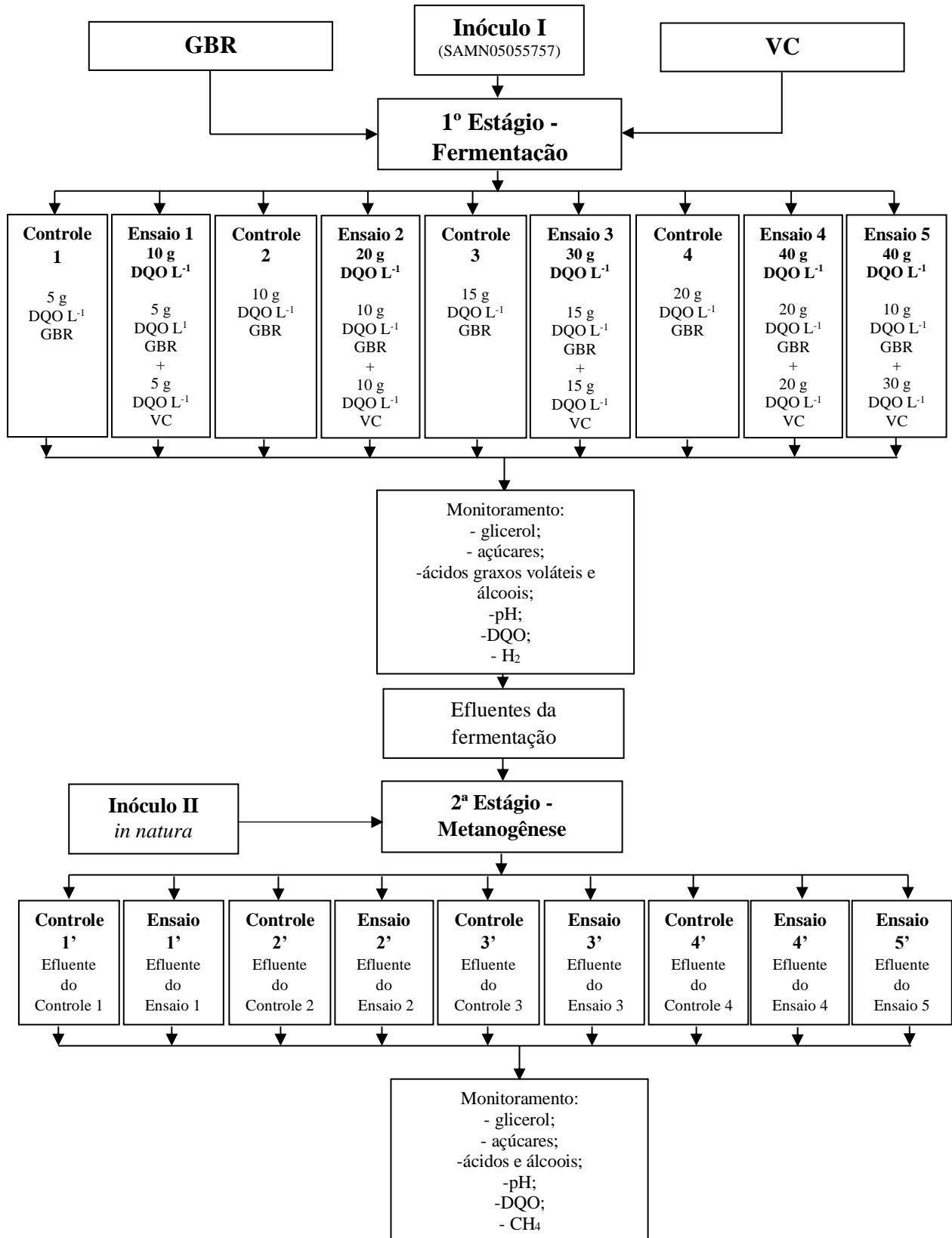
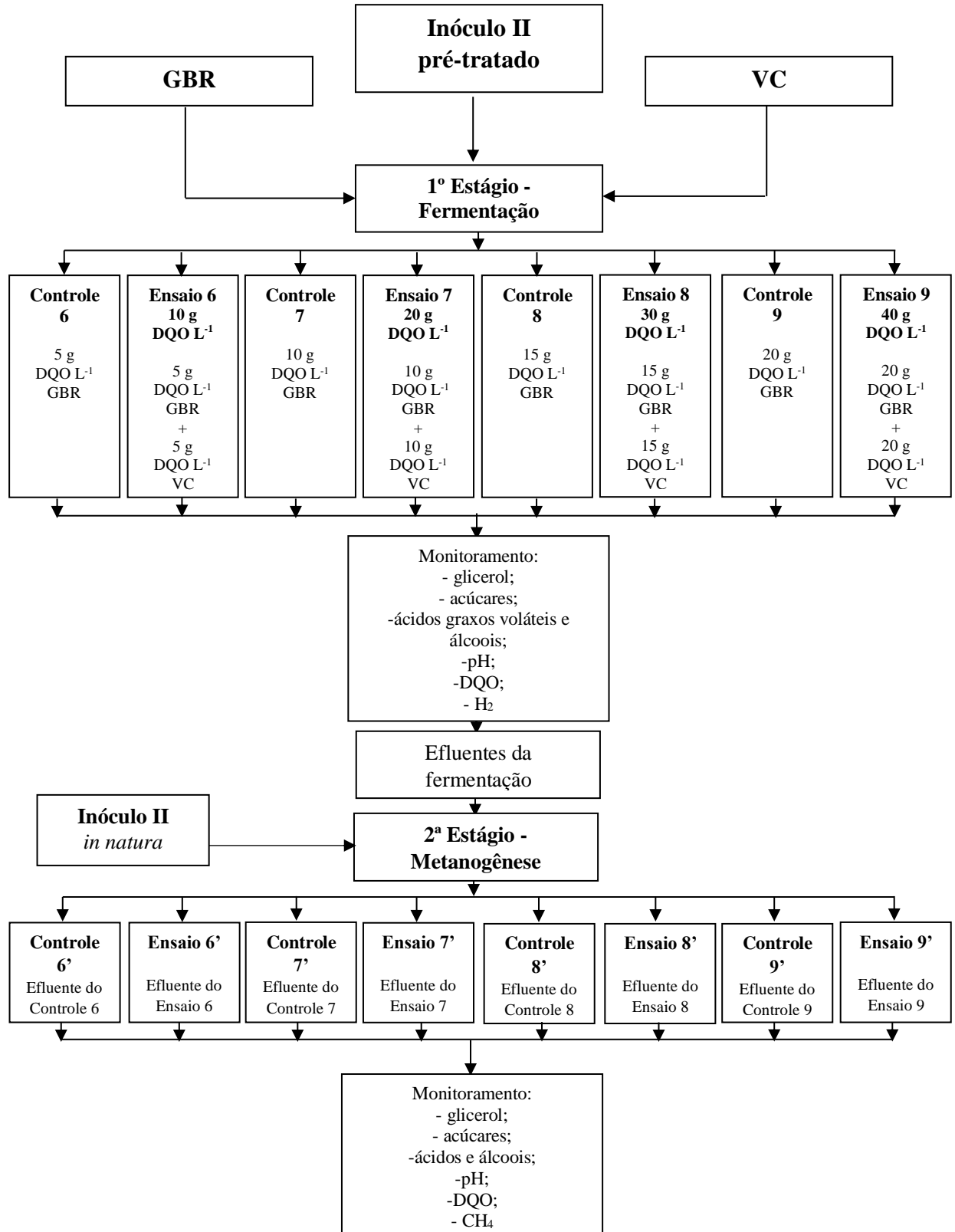


Figura 4.5 - Codigestão do GBR em VC em reatores anaeróbico em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo II após pré-tratamento ácido.



4.3.2 Análises da codigestão para cenários distintos com o inóculo de maior potencial de geração de H₂

Foram realizados ensaios na menor concentração de ambos os resíduos, glicerol bruto e VC, com o inóculo responsável pela maior produção de H₂; resultado esse obtido em experimentos anteriores. Duplicatas de reatores anaeróbios em batelada (500 mL) foram operados com o inóculo I em 10 g DQO L⁻¹ de resíduos para três condições distintas, 10, 11 e 12, sendo: ensaio 10 - 5 g DQO L⁻¹ GBRT e 5 g DQO L⁻¹ VC (Figura 4.6); ensaio 11- 5 g DQO L⁻¹ GBV e 5 g DQO L⁻¹ VC (Figura 4.7). Ambos os ensaios foram alimentados com meio PYG modificado (Tabela 4.1). Já o ensaio 12 foi operado na presença de 5 g DQO L⁻¹ GBR e 5 g DQO L⁻¹ VC diluídos em esgoto sanitário na ausência do meio de cultivo PYG modificado (Figura 4.8). Para os três ensaios, o volume de líquido total foi de 400 mL, *headspace* (100 mL) preenchido com N₂ (100 %), 0,12 STV (g L⁻¹) de inóculo em pH 5,5 e mantidos a 37 °C, sob modo estático. Assim, para cada condição, um controle contendo somente glicerol bruto como resíduo foi montado a fim de se fazer um comparativo com os ensaios de codigestão.

Todos os ensaios foram monitorados com amostras coletadas ao final de cada estágio, a fim de serem quantificados, no meio líquido, os metabólitos secundários, glicerol, açúcares, DQO e pH. O biogás produzido (CH₄ e H₂) foi determinado pela técnica de deslocamento de volume, apresentado na seção 4.6

Figura 4.6 - Codigestão do GBRT em VC em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.

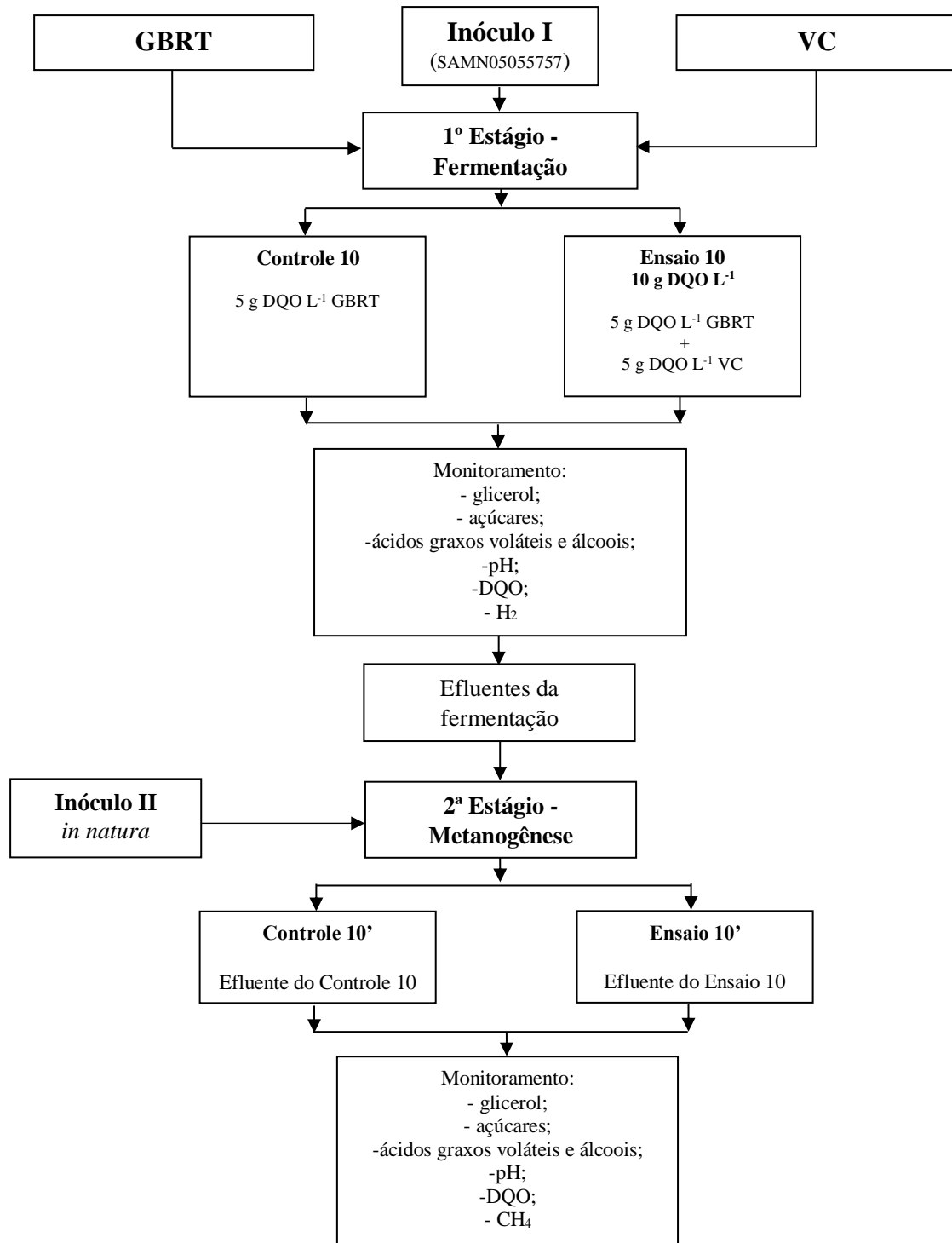


Figura 4.7 - Codigestão do GBV em VC em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.

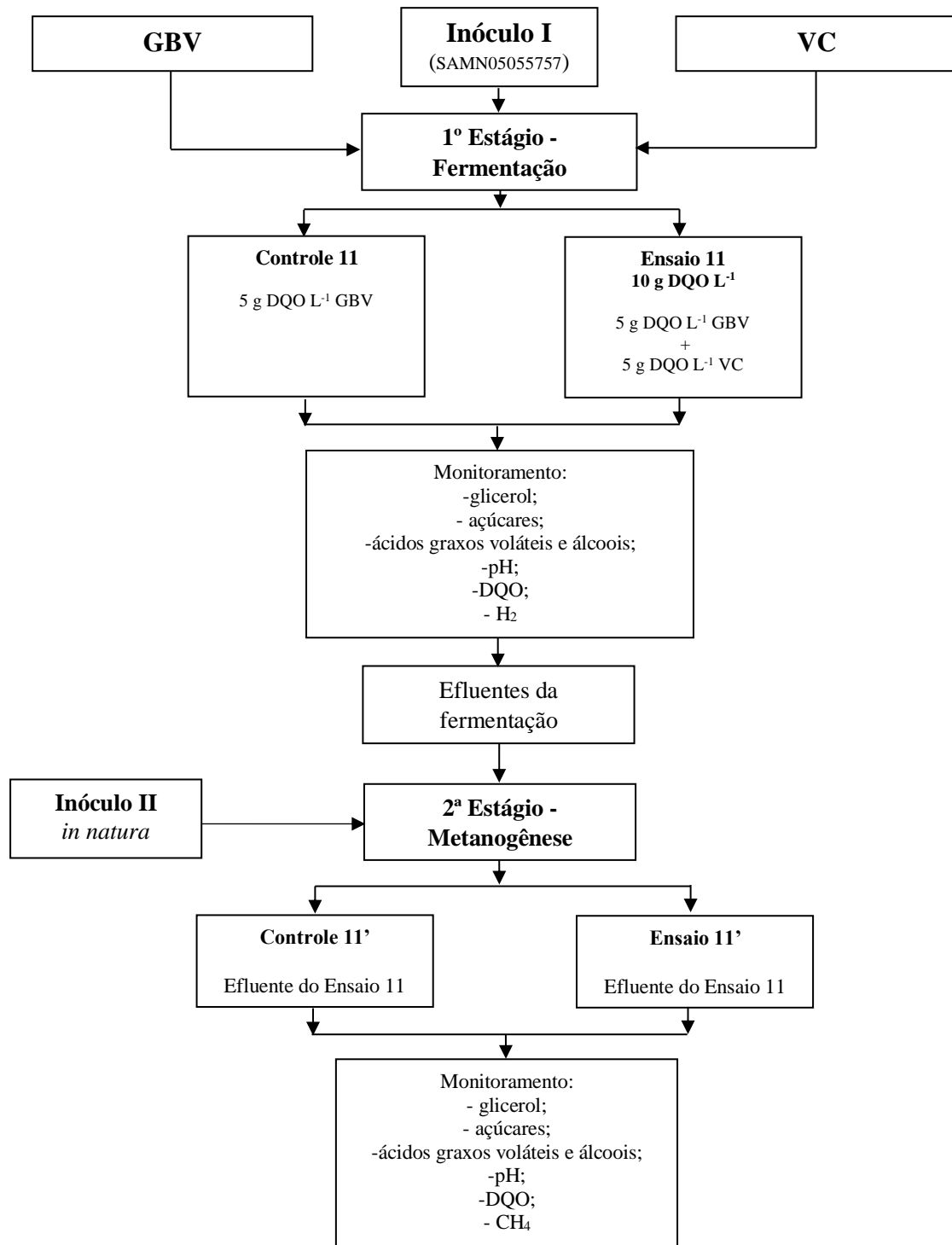
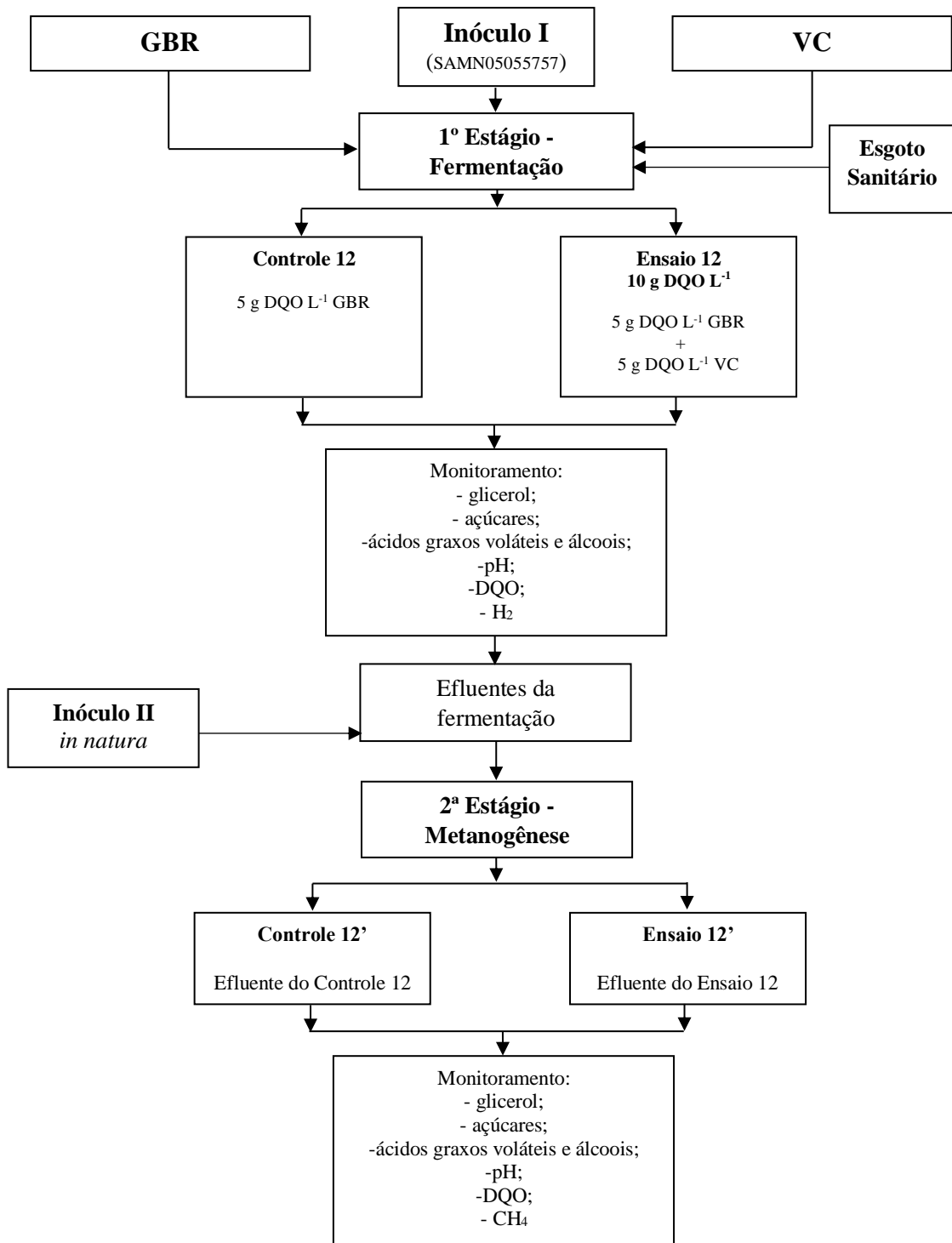


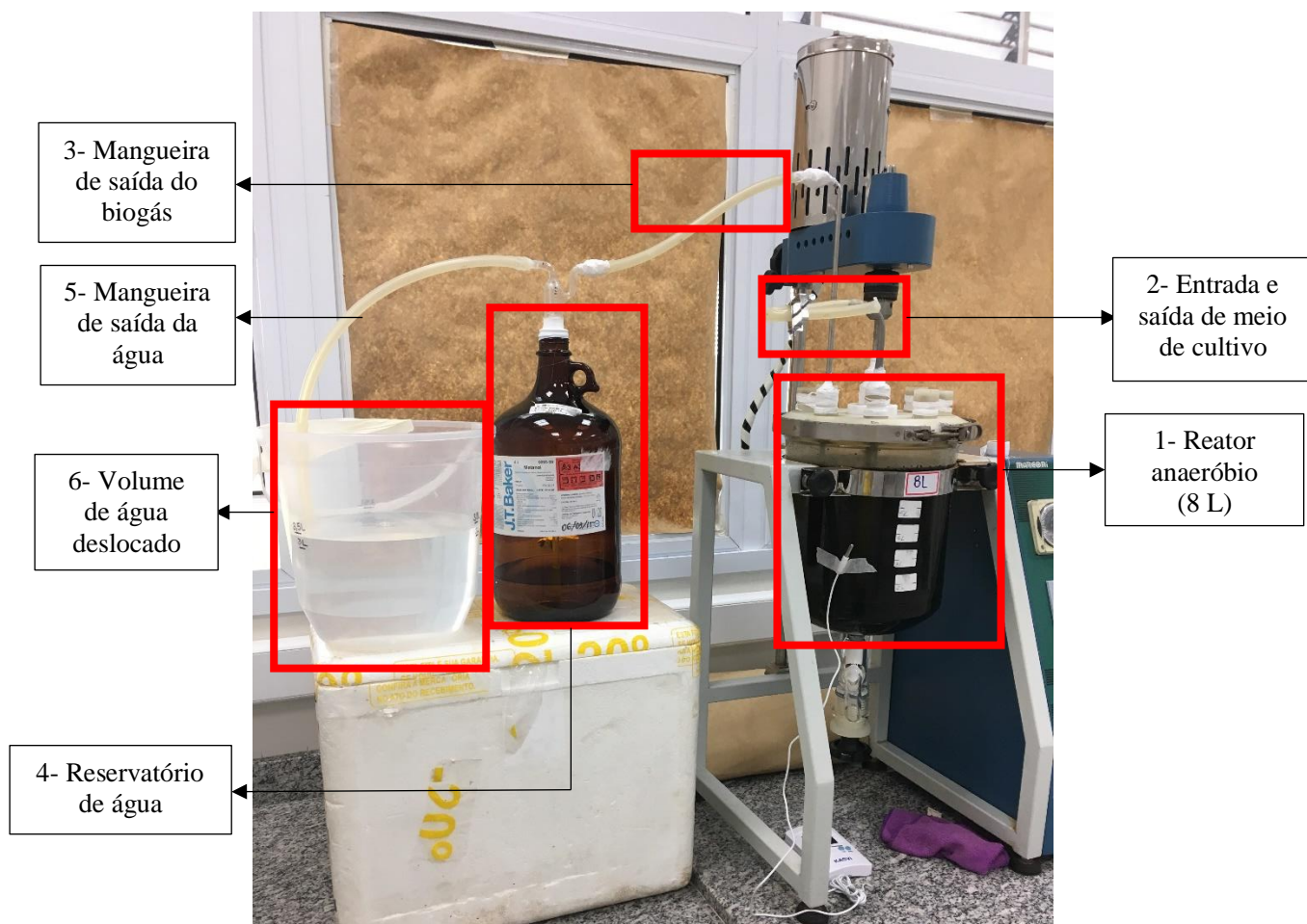
Figura 4.8 - Codigestão do GBR em VC, diluídos em esgoto sanitário, em reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais (fermentação e metanogênese), com o inóculo I.



4.4 Reator anaeróbio em batelada em estágio único e aumento de escala: metanogênese

Um reator em batelada de 8 L (volume total) foi operado em modo estático sob condições anaeróbias para a geração de biogás, sendo utilizados 4 L de lodo granular (inóculo II *in natura*), alimentados com 2 L de meio reacional na presença dos substratos GBR e VC em diferentes proporções e 2 L de *headspace* (Figura 4.9). Previamente à operação dos ensaios da codigestão, o lodo granular permaneceu confinado no reator durante 2 meses, sendo alimentado com meio de cultivo PYG modificado (Tabela 4.1), em pH 7.

Figura 4.9 - Sistema em aumento de escala: reator anaeróbio em batelada alimentado sob diferentes concentrações de substratos (GBR e VC).



Fonte: Elaboração própria, 2021

O reator foi operado sob 9 condições, denominadas como A, B, C, D, E, F, G, H, e I, diferindo-se quanto às concentrações de glicerina P.A., GBR e VC, conforme apresentado na

Tabela 4.2. O reator foi mantido em bancada, sem controle de temperatura. Para todos os ensaios, o pH foi mantido em 7,0, com adição de NaOH (1 M) ou HCL (1 M).

Tabela 4.2 - Composição dos ensaios A, B, C, D, E, F, G, H e I para o reator anaeróbio em aumento de escala.

Composição	Ensaio								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Glicerina P.A. (g DQO L ⁻¹)	15	10	5	-	-	-	-	-	-
GBR (g DQO L ⁻¹)	-	5	10	15	20	20	20	25	25
VC (g DQO L ⁻¹)	5	5	5	5	10	5	5	5	5
Extrato de carne (g L ⁻¹)	5	5	5	5	5	5	-	-	-
Extrato de levedura (g L ⁻¹)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Peptona de carne (g L ⁻¹)	5	5	5	5	5	5	-	-	-
Esgoto Sanitário (L)	-	-	-	-	-	-	-	-	2

Amostras finais de biogás foram coletadas por meio de uma seringa na mangueira de saída do biogás (Figura 4.9). O volume de água deslocado foi medido por meio de uma proveta e convertido para mmol de biogás L⁻¹. Amostras iniciais e finais foram coletadas para análises de pH, DQO, metabólitos secundários e remoções de açúcares e glicerol.

4.5 Análises físico-químicas e cromatográficas

4.5.1 Concentração de glicerol

Método físico-químico

As concentrações de glicerol dos ensaios fermentativos de 1 a 9, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos foram obtidas por meio do método físico-químico. A determinação foi realizada por espectrofotometria, por oxidação do glicerol livre

com meta periodato de sódio levando à formação de formaldeído. Para que o formaldeído pudesse ser quantificado, ocorreu uma segunda reação com duas moléculas de acetilcetona na presença de acetato de amônio, levando à formação de 3,5-diacetil 1,4-dihidrolutidina, reação conhecida como reação de Hantzsch. A curva de calibração (ANEXOS A e B) foi realizada usando glicerina pura como padrão. Para cada análise de glicerol, uma nova curva de calibração foi realizada, tendo em vista que os reagentes são instáveis ao longo do tempo e devem ser preparados diariamente para as análises. Foram usados 0,5 mL de amostra previamente diluída e colocada em tubo de 10 mL com 1,5 mL de solvente de trabalho (água destilada com etanol 95 % misturados em volumes iguais) e 1,2 mL de solução de periodato de sódio (21 mg de meta periodato de sódio + 5 mL de solução de ácido acético 1,6 M + 5 mL de solução de acetato de amônio 4,0 M). O tubo foi agitado por 30 segundos e a adicionado 1,2 mL de solução de acetilcetona (200 µL de acetilcetona + 5 mL de solução de ácido acético 1,6 M + 5 mL de solução de acetato de amônio 4,0 M). O tubo foi mantido em banho de água a 70 °C por 1 minuto e agitado manualmente. A seguir o tubo foi resfriado por imersão na água a 25 °C. Posteriormente, foi realizada a leitura espectrofotométrica das amostras a 410 nm (BONDIOLI; BELLA, 2005).

Método cromatográfico

Análises realizadas no NDCOM (Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) localizado no Instituto de Química (IQ) – UNESP, Araraquara/SP.

As concentrações de glicerol dos ensaios fermentativos de 10 a 12, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos, além dos ensaios de A a I, foram obtidas por meio do método cromatográfico. A análise foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas GCMS-QP2020 (Shimadzu) equipado com amostrador automático AOC-6000. Coluna capilar Zebron ZB-WAX (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Phenomenex). O hélio (pureza 99,999 %) foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. 1 mL de amostra foi homogeneamente misturada a 1 mL de acetonitrila e 500 µL desta mistura foi transferida para um frasco de 1,5 mL, contendo, previamente 500 µL de acetonitrila. A amostragem e injeção das amostras também foi realizada de forma totalmente automática, empregando-se um volume de 1 µL. A temperatura inicial do forno foi de 130 °C, aumentando para 220 °C a 20 °C min⁻¹, por 2 min. A injeção foi realizada em modo *split* à temperatura de 225 °C. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram de 250 °C e 220 °C, respectivamente. Informações sobre o tempo de retenção estão contidas no ANEXO C.

4.5.2 pH

A determinação do pH ocorreu de acordo com AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA)”, 2005.

4.5.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Alíquota de 1,25 mL da amostra diluída foi adicionada com 0,75 da solução de digestão (dicromato de potássio e sulfato de mercúrio) e 1,75 mL da solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata. O tubo foi fechado e agitado por inversão. A seguir a amostra foi colocada em digestor de DQO (Nanocolor® VARIO C2) durante 2 horas a 150 °C. Posteriormente, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm (“AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA)”, 2005). A curva de calibração está contida no ANEXO D.

4.5.4 Carboidratos Totais

A quantificação de carboidratos totais foi realizada segundo DUBOIS et al., (1956), por meio do método espectrofotométrico, adicionando-se 0,5 mL de solução de fenol (5 %) e 2,5 mL de H₂SO₄ a 0,5 mL de amostra previamente diluída. Após o tempo completo da reação (10 minutos), submergiu-se os frascos em banho maria (aproximadamente 15 minutos) e realizou-se leitura em espectrofotômetro a 490 nm. A curva de calibração está contida no ANEXO E.

4.5.5 Metabólitos secundários

Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID)

Análises realizadas no CEMPEQC (Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados) localizado no Instituto de Química (IQ) – UNESP, Araraquara/SP.

As concentrações dos metabólitos secundários dos ensaios fermentativos de 1 a 9, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos foram obtidas por meio do GC-FID. Metanol, etanol, acetona, propanol, ácido acético, isobutanol, butanol, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico e ácido caprótico, gerados após os processos fermentativos, foram determinados por cromatografia gasosa com detector por

ionização de chama (GC-FID). Anteriormente às análises por GC-FID, a biomassa era separada do meio líquido por centrifugação a 9000 rpm por 10 minutos a 4 °C, armazenando-se a fração líquida em freezer a -19 °C. Alíquotas de 2 mL das amostras eram transferidas para *vials* de 22 mL com 1 g de NaCl (para fornecer o efeito “*salting out*”). Os compostos orgânicos foram mensurados por GC-FID (Shimadzu, Modelo 2010) equipado com amostrador automático de *headspace* (AOC-5000 Plus), injetor split/splitless, detector por ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida 30,00 m x 0,32 mm x 3,00 mm (Restek, RTX-1). Anteriormente à injeção, as amostras foram aquecidas a 100 °C e agitadas por 15 minutos. Ambos injetor e detector permaneceram a 250 °C. Hélio foi usado como gás de arraste com taxa de 1,00 mL min⁻¹ (51,6 cm s⁻¹). A temperatura do forno foi programa inicialmente a 45 °C por 1 minuto seguido de uma rampa de 50 °C min⁻¹ até a temperatura final de 250 °C, mantidos por 3 minutos. Os compostos foram quantificados pelo método de calibração externa (NESPECA et al., 2017). Informações sobre a curva de calibração estão no ANEXO F.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Análises realizadas no NDCOM (Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) localizado no Instituto de Química (IQ) – UNESP, Araraquara/SP.

As concentrações dos metabólitos secundários dos ensaios fermentativos de 10 a 12, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos, além dos ensaios de A a I, foram obtidas por meio do GC-MS. Etanol, metanol, propanol, 1-butanol e 2-butanol, acetona e os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalético e valérico também foram identificados e quantificados em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas GCMS-QP2020 (Shimadzu) equipado com amostrador automático AOC-6000. Para estas análises, foi utilizada uma coluna capilar Zebron ZB-WAX (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Phenomenex). O hélio (pureza 99,999 %) foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi programada para 35 °C por 5 min, aumentando para 145 °C a 50 °C min⁻¹, permanecendo nessa temperatura por 4 min. Foram adicionados 3,5 mL de cada amostra a *vials* de 10 mL, que permaneceram sob encubação a 85 °C por 10 min. Para injeção, empregou-se uma alíquota de 1000 µL do *headspace* destes frascos. A temperatura de injeção foi programada para 220 °C, com injeção no modo *splitless*. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram de 230 °C e 220 °C, respectivamente. O tempo de *solvente cut* foi de 1 min. Os fragmentos de massas selecionados durante as análises para a identificação e quantificação foram: m/z 27, 29, 31, 32, 33, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 55, 58, 59, 60, 73, 74 e 87. O 1,3-PD foi determinado no mesmo equipamento, utilizando a mesma

coluna e o mesmo gás de arraste vazão de (1,5 mL min⁻¹). Para preparar as amostras para injeção direta do substrato residual, um volume de 1 mL deste foi homogeneamente misturado a 1 mL de acetonitrila e 500 µL desta mistura foram transferidos para frascos 1,5 mL, contendo previamente 500 µL de acetonitrila. A amostragem e injeção das amostras também foi realizada de forma totalmente automática, empregando-se um volume de 1 µL. A temperatura inicial do forno foi de 130 °C, aumentando para 220 °C a 20 °C min⁻¹, por 2 min. A injeção foi realizada em modo *split* à temperatura de 225 °C. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram de 250 °C e 220 °C, respectivamente. Informações sobre a curva de calibração no ANEXO G.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A concentração de ácido láctico foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e realizada no laboratório do IPBEN (Instituto de Pesquisa em Bioenergia) – UNESP Araraquara/SP. As amostras inicialmente foram filtradas em filtro Sep Pack C18 e injetadas em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração RID. Durante a cromatografia, o ácido láctico foi separado através da utilização de fase móvel H₂SO₄ 0,01 N, filtrado a vácuo em membrana HAWP 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro (MILLIPORE), em uma coluna analítica BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 60 °C à velocidade de fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Informações sobre o tempo de retenção estão descritas no ANEXO H.

4.6 Determinação de biogás

Cromatografia Gasosa (GC)

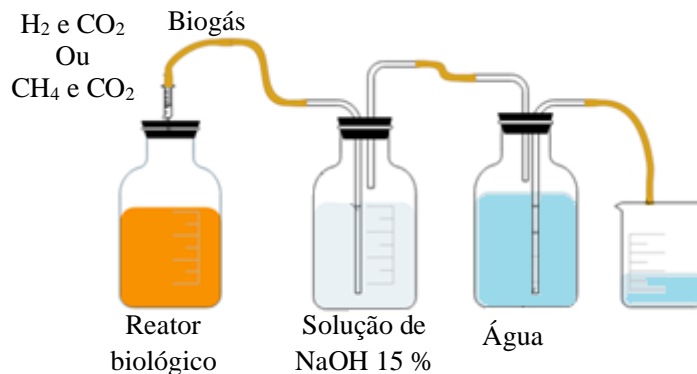
Para a identificação e quantificação dos produtos gasosos (H₂, CH₄ e CO₂) provenientes do processo de digestão anaeróbia, empregou-se o cromatógrafo gasoso GC-2010 Plus ATF (SHIMADZU) equipado com injetor capilar *split/splitless*, detector de ionização por chama (FID) e detector de condutividade térmica (TCD). Essas análises foram realizadas esporadicamente. Foram empregadas as seguintes condições: (*FID*) - Coluna SH-Rt@-Q-BOND (30,0 × 0,53 mm × 20,0 µm); injeção em modo *split*, empregando N₂ (99,999 %) como gás de arraste, 18,3 kPa de pressão, fluxo de purga e fluxo total de 3,0 e 96,0 mL min⁻¹, respectivamente. A temperatura do injetor foi programada para 250 °C e a do detector, para 200 °C. (*TCD*): coluna capilar Carboxen@-1010 (30,0 m × 0,53 mm × 30 µm), Supelco; empregando Argônio (pureza 99,999%) como gás de arraste em injeção direta, utilizando-se fluxo de purga e fluxo total de 1,0 e 3,0 mL min⁻¹, respectivamente. As temperaturas do injetor

e detector foram 250 °C e 180 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi ajustada para 35 °C por 7,0 min. Após este período, aumentou-se a temperatura para 170 °C a 24 °C min⁻¹, por 5 min, com tempo total de análise de 17,63 min. A calibração deste equipamento foi realizada utilizando-se mistura padrão de gases H₂, CO, CH₄ e CO₂ (25 % cada, pureza 99,999 %) (ANEXO I).

Medição volumétrica

O H₂ e o CH₄ dos ensaios de 1 a 12 foram quantificados por um sistema de medição volumétrica adaptado do modelo descrito por AQUINO et al., (2007). A cada 2 horas, para os ensaios fermentativos, e a cada 24 horas, para os ensaios metanogênicos, foram realizadas as medidas do biogás nos reatores. Uma agulha com uma seringa era injetada na tampa de borracha do reator, onde o biogás do *headspace* passava por meio de uma mangueira que se conectava ao primeiro frasco contendo solução de NaOH 15 % (Figura 4.10). Os volumes de H₂ e CH₄ produzidos foram aferidos medindo-se o volume do biogás lavado por meio de uma proveta graduada. Previamente à medição, os reatores eram agitados manualmente, forçando desse modo a saída do biogás presente no meio líquido para o *headspace*.

Figura 4.10 - Sistema de medição volumétrica para quantificação de biogás.



Fonte: Adaptado de PACHIEGA (2019).

4.7 Microscopias

4.7.1 Microscopia ótica

Microscopias realizadas no laboratório do IPBEN (Instituto de Pesquisa em Bioenergia) – UNESP Rio Claro/SP.

Foram feitos exames microscópicos através de contraste de fase e luz comum em microscópio Olympus para observação das morfologias predominantes dos inóculos I e II. A captura das imagens foi realizada em câmera Moticam 2000 e software MOTIC Images Plus 2.0, com captura de imagens, em ampliação de 1000X. (RODRIGUES et al., 2016).

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química da UNESP, Araraquara/São Paulo. O inóculo II foi seco por 7 dias em um dessecador contendo dessecante de esferas de sílica em um meio de vácuo em temperatura ambiente. A seguir, a amostra obtida foi revestida com carbono. O sistema de revestimento BAL-TEC (modelo SCD-50) equipado com uma bomba de vácuo turbo molecular (EDWARDS T-STATION / 75DXNW40) foi usada para os revestimentos. A distância entre o alvo e a amostra foi mantida a 50 mm para todas as deposições. Durante a deposição, o vácuo foi mantido a 2×10^{-1} mbar. Todas as imagens foram coletadas usando uma emissão de campo frio do microscópio eletrônico de varredura (FE-SEM; JEOL modelo 7500F) com as seguintes condições operacionais: tensão de aceleração de 2 kV, corrente de emissão de 10 μ A, sonda de corrente de 9, distância de trabalho em 7,7 mm, modo de imagem de elétron secundário (SE) e 100.000X de ampliação (1 pixel = 0,935 nm) (BARRETO; TITA; ORLANDI, 2019).

4.8 Análise dos consórcios anaeróbios

4.8.1 Enumeração de bactérias produtoras de H₂ no inóculo II pré-tratado por técnica de *pourplate*.

Os meios de cultivo específicos para as espécies *Clostridium* sp.; *Enterobacteriaceae* sp.; *Bacteroides* sp.; *Lactobacillus* sp.; *Streptococcus* sp. e *Veillonella* sp. para a quantificação de colônias foram, respectivamente: Neomycin nagler (NN) (pH 7,6); Desoxycholate hydrogen sulfide lactose (DHL) (pH 7,4); Neomycin brilliant green taurocholate (NBGT) (pH 7,6); Lactobacilli selective (LBS) (pH 7,5); Triphenyl tetrazolium cholate acridine orange thallos

sulfate aesculim crystal violet (TATAC) (pH 7,6) e Veillonella selective (VS) (pH 7,5) (SONG et al., 2012), cuja composição está apresentada nas tabelas 4.3 a 4.8.

Tabela 4.3 - Composição do Meio de Cultivo NN.

Composto	Concentração (g L⁻¹)
Peptona	40,0
Na ₂ HPO ₄	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NaCl	2,0
MgSO ₄	0,1
Glicose	2,0
Ágar	25,0

Tabela 4.4 - Composição do Meio de Cultivo DHL.

Composto	Concentração (g L⁻¹)
Extrato de Carne	3,0
Peptona	20,0
Sacarose	10,0
Deoxicolato de Sódio	1,0
Tiosulfato de Sódio	2,3
Citrato de Amônio Férrico	1,0
Citrato de Sódio	1,0
Ágar	25,0

Tabela 4.5 - Composição do Meio de Cultivo NBGT.

Composto	Concentração (g L⁻¹)
Peptona	10,0
Extrato de Carne	5,0
Na ₂ HPO ₄	4,0
Glicose	1,5
Amido	0,5
L-cis	0,5
Taurocolato de Sódio Hidratado	1,0
Ágar	25,0

Tabela 4.6 - Composição do Meio de Cultivo LBS.

Composto	Concentração (g L⁻¹)
Peptona	15,0
Extrato de Levedura	2,0
Glicose	20,0
Amido	0,5
NaCl	5,0
5% L-cis	10,0 mL
Acetato de Sódio	15,0
Ácido Acético	3,7 mL
Ágar	25,0

Tabela 4.7 - Composição do Meio de Cultivo TATAC.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Peptona	15,0
Triptona	10,0
Extrato de Levedura	10,0
Sacarose	1,0
Esculina Hidratada	1,0
Azida de Sódio	0,45
Ágar	25,0

Tabela 4.8 - Composição do Meio de Cultivo VS.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Triptona	5,0
Extrato de Levedura	3,0
Ácido Tioglicólico (CH ₂ (SH)COONa)	0,75
Tween-80	1,0
Lactato de Sódio 50% (C ₃ H ₅ O ₃ Na)	25 mL
Ágar	25,0

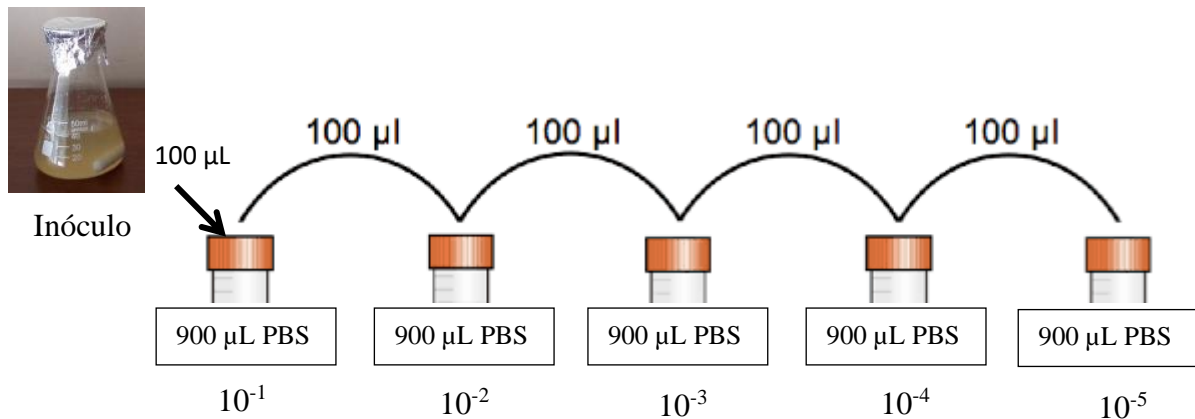
Os preparos dos meios de cultivo foram por aquecimento até a diluição completa do ágar e posteriormente autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Cerca de 25 mL dos meios ainda quentes foram adicionados às placas. Estas foram mantidas semiabertas para saída do vapor, evitando o acúmulo de água na tampa. Após o resfriamento completo, foram realizadas as incubações.

Antes da incubação, 5 diluições do inóculo II pré-tratado, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram realizadas. 900 µL de PBS (tampão fosfato-salino) foram adicionados em cada *ependorf* correspondente a cada diluição, conforme apresentado na Figura 4.11. 100 µL do inóculo foi transferido para a 1ª diluição (10⁻¹). 100 µL do inóculo na diluição 10⁻¹ foi transferido para o segundo *ependorf* com 900 µL de PBS (2ª diluição - 10⁻²). O procedimento foi repetido para as diluições seguintes (10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵) (Figura 4.11).

Os inóculos diluídos foram adicionados no centro das placas, em triplicata (100 µL). Após a inoculação foi promovido o espalhamento da amostra na superfície da placa com o auxílio de uma alça de drigalski. As placas inoculadas foram empilhadas dentro da jarra de anaerobiose com um indicador e o sachê de anaerobiose. Esta foi mantida a 36 °C. A contagem das colônias ocorreu após 6 dias de incubação. O resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/ mL foi determinado de acordo com a equação 4.1.

$$n^{\circ} \text{ de colônias} \times (\text{diluição} + \text{volume da amostra adicionada}) \quad \text{Eq. 4.1}$$

Figura 4.11 - Diluições seriadas do inóculo II para o plaqueamento.



Fonte: Elaboração própria, 2021

4.8.2 Biologia Molecular e Bioinformática

Foram realizadas análises de Biologia Molecular para o inóculo II em diferentes estágios, sendo:

- (a) AMOSTRA 1: Inóculo II *in natura* para a determinação dos Domínios Arquéia e Bacteria;
- (b) AMOSTRA 2: Inóculo II após pré-tratamento ácido (para determinação do Domínio Bacteria);
- (c) AMOSTRA 3: Inóculo II após a realização dos ensaios de codigestão glicerol/glicose (para determinação do Domínio Bacteria).

O processo de extração do DNA foi realizado com fenol-clorofórmio como descrita por GRIFFITHS et al., (2000) com modificações. Foi usado fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v). Foram realizados testes de verificação da integridade do DNA extraído pela proporção de 260/280 nm > 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE). A seguir, a amostra foi seca em temperatura ambiente por 24 h em capela e posteriormente armazenada a -20 °C até o seu envio ao GENONE® (Rio de Janeiro-RJ, Brasil) para a realização da identificação, utilizando a plataforma NGS Illumina MiSeq (SI et al., 2015).

Na GENONE® (Rio de Janeiro-RJ, Brasil) foi realizada amplificação por PCR das amostras do DNA enviado utilizando o primer 515F (5'-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), para amplificar as regiões V4 do gene 16S RNA ribossômico por meio do GeneAmp PCR System (ABI company, USA). As amostras

contendo entre 400-450 pares de base (de acordo com o gel de agarose) foram escolhidas para as etapas seguintes. Tais amostras foram misturadas e purificadas com o Kit de extração em gel Qiagen (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas geradas com o Kit NEBNext[®]Ultra[™]DNA e quantificadas via Qubit e Q-PCR, foram analisadas pela plataforma Illumina Miseq.

As sequências tiveram os primers e *barcodes* retirados. A mescla de tais sequências foi realizada por meio da ferramenta FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>). As sequências de processamento foram denominadas *tags* brutas. O refinamento de tais *tags* foi realizado sob condições específicas para resultar em *tags* limpas de alta qualidade de acordo com processo de qualidade Qiime[®] (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html). As *tags* foram comparadas a um banco de dado de referência (Gold Database http://drive5.com/uchime/uchime_download.html), utilizando o algoritmo UCHIME (UCHIME Algorithm, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) para detecção de quimeras (http://www.drive5.com/usearch/manual/chimera_formation.html). Após esse processo, as sequências caracterizadas como quimeras foram removidas e as *tags* efetivas foram obtidas.

As análises das sequências foram realizadas pelo software Uparse[®] (Uparse v7.0.1001 <http://drive5.com/uparse/>) utilizando todas as *tags* efetivas. Sequências com similaridade ≥ 97 % foram agrupadas na mesma OTU (Operational Taxonomic Unit). A sequência representativa para cada OTU foi lida por meio do software Mothur[®] apoiado na base de dados SSUrRNA do banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) para anotação das espécies para eixo taxonômico (Threshold:0.8~1) (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie). Para obter a relação filogenética entre todas as sequências representativas das OTUs, a ferramenta MUSCLE[®] (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) foi utilizada para comparar as múltiplas sequências rapidamente. As abundâncias de informações sobre as OTUs foram normalizadas usando um número de sequências padrão correspondente à amostra com as menores sequências. Após a identificação, as sequências foram submetidas ao “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.9 Cálculo de Perspectiva de Reuso Energético (PRE)

Foram avaliadas as Perspectivas de Reuso Energético (PRE) para cada ensaio. Os valores de PRE foram calculados de acordo com as equações 4.2 e 4.3, considerando que o conteúdo energético de H₂ é 284 kJ mol⁻¹ e o de CH₄ é 882,2 kJ mol⁻¹, respectivamente (RODRIGUES et al., 2020b).

$$\text{PRE (H}_2\text{)} = \left(\frac{\text{mol H}_2 \text{ produzido}}{\text{L de substrato}} \right) \times \left(\frac{284,0 \text{ kJ}}{\text{mol}} \right) \quad \text{Eq. 4.2}$$

$$\text{PRE (CH}_4\text{)} = \left(\frac{\text{mol CH}_4 \text{ produzido}}{\text{L de substrato}} \right) \times \left(\frac{882,2 \text{ kJ}}{\text{mol}} \right) \quad \text{Eq. 4.3}$$

4.10 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais obtidos durante os ensaios foram ajustados para os valores médios obtidos das duplicatas dos reatores em batelada utilizando o software Statistica® (versão 8.0). A taxa máxima de produção de biogás foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificada (LAY; LI; NOIKE, 1998) indicada abaixo pela equação 4.4, onde: P é o potencial de produção de biogás (mmol L^{-1} cultura), R_m é a taxa máxima de produção de biogás (mmol L^{-1} cultura. h), λ é o tempo de início da produção do biogás (h) e e vale 2,718281828.

$$H = P \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. 4.4}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação de H₂ após os pré-tratamentos no inóculo II

Foram verificadas gerações de H₂ nos reatores operados com inóculo II submetidos ao choque térmico, ataque ácido, ataque básico e diluições seriadas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Concentrações de H₂ após os pré-tratamentos em pH 5,5, e 6,0 para o inóculo II.

Pré-tratamento	H ₂ (mmol L ⁻¹)	H ₂ (mmol L ⁻¹)
	em pH 5,5	em pH 6,0
Choque Térmico	0,10	0,70
Ataque Ácido	0,04	10,80
Ataque Básico	0,20	2,90
Congelamento e Descongelamento	-	-
Diluições Seriadas 24 h	0,10	-
Diluições Seriadas 10 ⁻¹⁰	-	-
Dessecação	-	-

Para todos os pré-tratamentos realizados, não foram detectadas gerações de CH₄. A ausência de CH₄ implicou que os processos de pré-tratamento da biomassa para a inibição da atividade metanogênica foram efetivos. O pré-tratamento ácido resultou na maior produção de H₂, sendo gerados 10,8 mmol H₂ L⁻¹, seguido do pré-tratamento básico, com 2,9 mmol H₂ L⁻¹ e do choque térmico com 0,7 mmol H₂ L⁻¹ (Tabela 5.1). Na análise dos resultados por ANOVA com correções para a heterogeneidade de variâncias (Welch) seguido de comparações múltiplas (Games-Howell) foi verificada a diferença estatística entre a geração de H₂ por meio do ataque ácido, básico e choque térmico. O nível de significância adotado foi de 5 %. Concluiu-se que houve diferença estatística entre os resultados encontrados para a geração do biogás. Assim, o melhor pré-tratamento aplicado ao inóculo II para a geração de H₂ foi o ataque ácido.

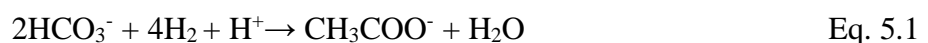
Segundo WANG; YIN, (2017), o pH altera a carga elétrica na membrana celular, afetando assim a atividade enzimática, interferindo na absorção de nutrientes pelos microrganismos. Logo, arqueias metanogênicas são apenas ativas em uma faixa estreita de pH entre 6,3 e 7,8 (LI; FANG, 2007). Assim, ajustar o pH do inóculo em faixas inferiores ou superiores ao pH ótimo foram comprovadamente eficientes para a inibição da atividade metanogênica. Por outro lado, algumas bactérias produtoras de H₂, como *Clostridium* sp. são capazes de formar endósporos como uma reação às condições ambientais adversas, resultando

em elevadas produções de H₂ como observadas para o inóculo II após os pré-tratamentos ácido e básico.

YANG; WANG, (2018) realizaram estudos da comunidade e cinética bacteriana na análise de produção de H₂ utilizando 5 diferentes pré-tratamentos (choque-térmico, ácido, básico, aeração e radiação gama) em lodo anaeróbio, avaliando a remoção de azevém (tipo de gramínea). Os vários métodos de pré-tratamento causaram grandes variações no desempenho de produção de H₂. O pré-tratamento ácido foi o mais eficiente (76 mL H₂), seguido do pré-tratamento básico (70 mL H₂), choque-térmico (58 mL H₂), aeração (56 mL H₂) e radiação gamma (53 mL H₂). A espécie *Clostridium sensu stricto 1* apresentou uma maior abundância relativa após o pré-tratamento ácido (80,4 %), comparado com 52,1 %, 45,2 %, 58,9 % e 63,4 % para radiação gama, aeração, choque-térmico e pré-tratamento básico, respectivamente. Segundo os autores, esta espécie de *Clostridium* sp. contribuiu de forma mais efetiva para a geração de H₂ e apresentou resistência após o tratamento ácido.

No presente estudo, o ataque básico resultou em uma menor concentração de H₂ quando comparado ao ataque ácido. Porém, alguns autores relatam elevadas gerações de H₂ para o ataque básico quando comparado ao ácido, como WANG; WAN, (2008), que obtiveram 125,9 mL de H₂ após o ataque básico no lodo de estação de tratamento de esgoto quando comparado a 96,8 mL de H₂ após o ataque ácido. Segundo WANG; YIN, (2017), a razão para estas diferenças nas produções de H₂ quanto aos pré-tratamentos se deveu à diferença da comunidade microbiana presente nestes inóculos, sendo de origens distintas tanto no presente estudo, quanto no apresentado por WANG; WAN, (2008).

Apesar do pré-tratamento envolvendo calor, como o choque térmico, se mostrar eficiente, no presente estudo houve uma geração de H₂ reduzida. OH; GINKEL e LOGAN (2003) observaram a permanência de algumas bactérias homoacetogênicas, que produzem ácido acético a partir do H₂ e CO₂ (Eq. 5.1), e que poderiam sobreviver ao choque-térmico, fornecendo assim baixos rendimentos de gás hidrogênio como no presente estudo. Este pré-tratamento pode ter sido suficiente para evitar a atividade das arqueias metanogênicas, porém não conseguiu impedir a presença de bactérias homoacetogênicas formadoras de endósporos que possuem capacidade de resistir às condições extremas impostas por este pré-tratamento.



Para os demais pré-tratamentos onde não foram observadas gerações de H₂ e CH₄, concluiu-se que foram extremamente intensos para o inóculo testado. Quanto ao congelamento

e descongelamento, as fortes flutuações de temperatura levaram à formação de cristais de gelo dentro das células microbianas, provocando o seu inchaço, danificando-as e interrompendo agregados celulares (WANG; YIN, 2017). MOHAMMADI et al., (2011) realizaram vários pré-tratamentos em um lodo de estação de tratamento de águas residuárias e concluíram que congelamento e descongelamento foi responsável pela menor influência na produção de H₂, gerando apenas 4 mmol H₂ quando comparado com o pré-tratamento envolvendo o choque térmico (8,89 mmol de H₂), por exemplo.

Quanto às diluições seriais, o tempo de incubação pode não ter sido suficiente para garantir o crescimento microbiano, inviabilizando tanto o crescimento das arqueias metanogênicas quanto das bactérias produtoras de H₂.

De acordo com ROSSI et al., (2011), após o pré-tratamento de dessecação, o 1,3-PD foi o produto majoritário gerado durante a fermentação da glicerina. A bioconversão do glicerol dada pela rota redutiva (com a formação do 1,3-PD) induz a baixos rendimentos de H₂. Segundo RODRIGUES et al., (2019b), quando 1 mol de 1,3-PD é produzido, 1 mol de H₂ é consumido. Assim, conforme observado no presente estudo, para a dessecação não foi observada geração de H₂, podendo ser induzida a rota metabólica redutiva, sem a geração desse biogás.

A caracterização por meio da biologia molecular proporcionou um conhecimento detalhado da composição da comunidade bacteriana após o pré-tratamento ácido (amostra 2) (Figura 5.1)

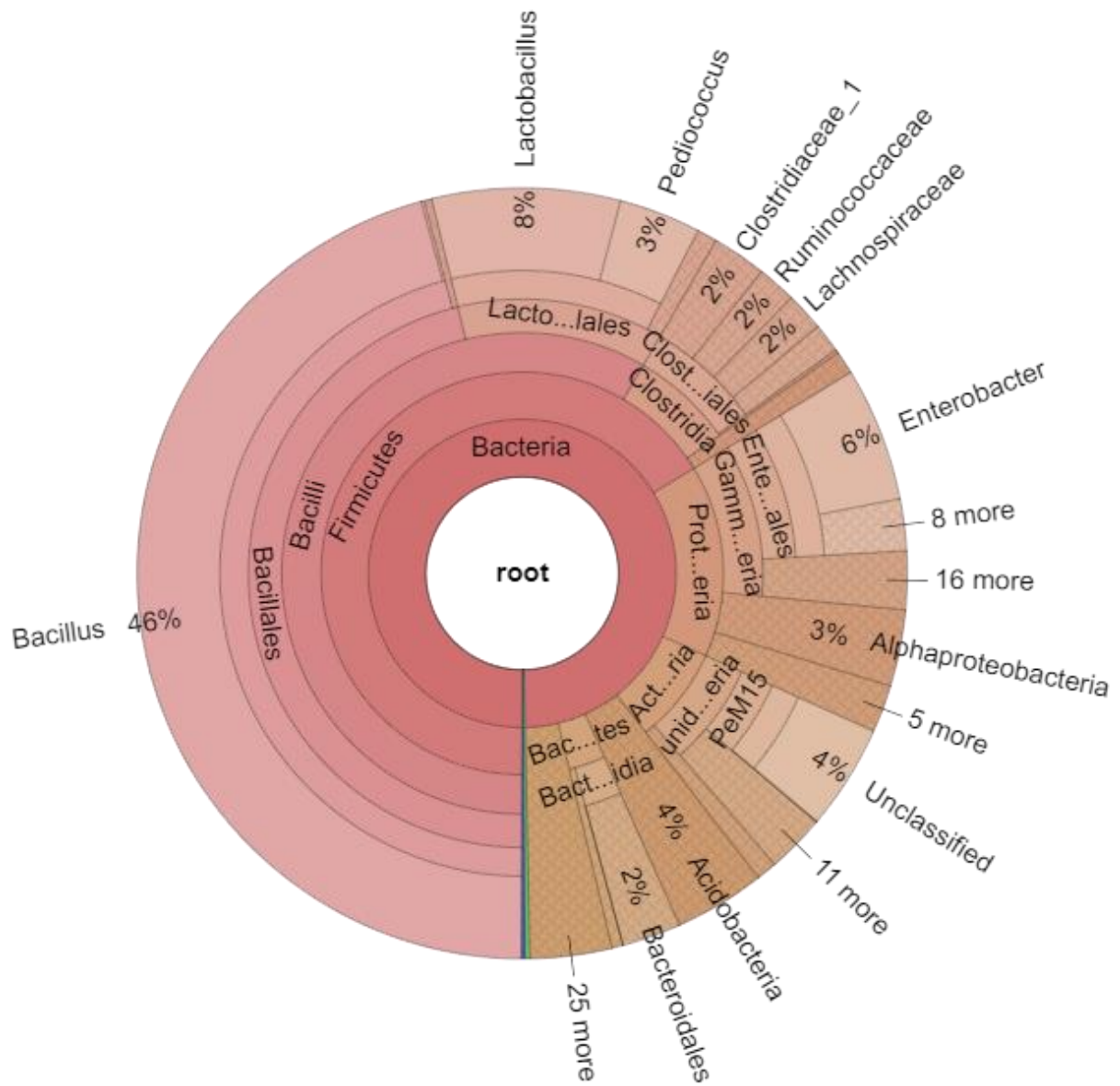
As maiores abundâncias relativas foram encontradas para os gêneros *Bacillus* (45,76 %), *Lactobacillus* (7,88 %), *Enterobacter* (5,62 %), *Pediococcus* (3,43 %) e *Clostridium_sensu_stricto_1* (0,89 %).

Os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Clostridium* compreendem nos principais microrganismos produtores de H₂ (EDER et al., 2020). Dessa forma, a seleção ocasionada por meio do pré-tratamento ácido foi efetiva.

LIU et al., (2009) determinaram o efeito de quatro diferentes pré-tratamentos ao lodo de ambiente marinho a fim de ser avaliada a geração de H₂. O tratamento ácido, segundo os autores, promoveu uma maior eficiência de geração de H₂ (0,86 mol H₂ mol⁻¹ glicose), enquanto os demais pré-tratamentos como choque térmico, congelamento e descongelamento e o ataque básico geraram 0,41, 0,17 e 0,11 mol H₂ mol⁻¹ glicose, respectivamente. Os resultados obtidos por DGGE mostraram que os métodos de pré-tratamento alteraram a comunidade microbiana geradora de H₂. Os autores obtiveram após o pré-tratamento ácido o domínio de microrganismos *Clostridium* e *Bacillus*. No entanto, após o pré-tratamento térmico, as bactérias dominantes foram *Clostridium* sp. e *Enterococcus* sp. Em contrapartida, *Clostridium* sp. e

Lactobacillus sp. foram dominantes na comunidade microbiana após o pré-tratamento básico. Esta diferença das comunidades dominantes após os pré-tratamentos em relação ao presente estudo se deveu à origem do consórcio misto. Enquanto no trabalho de LIU et al., (2009), o lodo foi coletado na zona entre marés de uma praia própria para banho e, no presente estudo, o lodo granular mesofílico foi obtido do reator UASB usado no tratamento de água residuária do abatedouro de aves, o que possivelmente já apresentava uma diferença significativa da comunidade microbiana original.

Figura 5.1 - Visão geral dos microrganismos encontrados para a amostra 2 (inóculo II após o pré-tratamento ácido).



O gênero *Bacillus* é amplamente conhecido por sua capacidade de formação de endósporos frente às condições ambientais extremas e por metabolizar uma variedade de carboidratos à H₂ (MAINTINGUER et al., 2008), podendo sobreviver às técnicas comuns de pré-tratamentos (EDER et al., 2020; FAN et al., 2021). Certamente, a elevada abundância relativa encontrada para este gênero ao final do pré-tratamento ácido no presente estudo corrobora sua resistência nas condições adversas aplicadas.

Lactobacillus sp. sofrem mutações em seus genes mediante *stress* ácido, o que implicou na capacidade de resistir às condições adversas impostas pelo pré-tratamento ácido no presente estudo. Segundo PALUD et al., (2018), quando *Lactobacillus* sp. é submetido ao *stress* ácido, a elevada atividade da fosfotransferase pode elevar os níveis de ATP via glicólise, o que permite a manutenção do pH intracelular, não interferindo na atividade celular deste microrganismo, que se mostra tolerante às condições adversas (KALNENIECE et al., 2020).

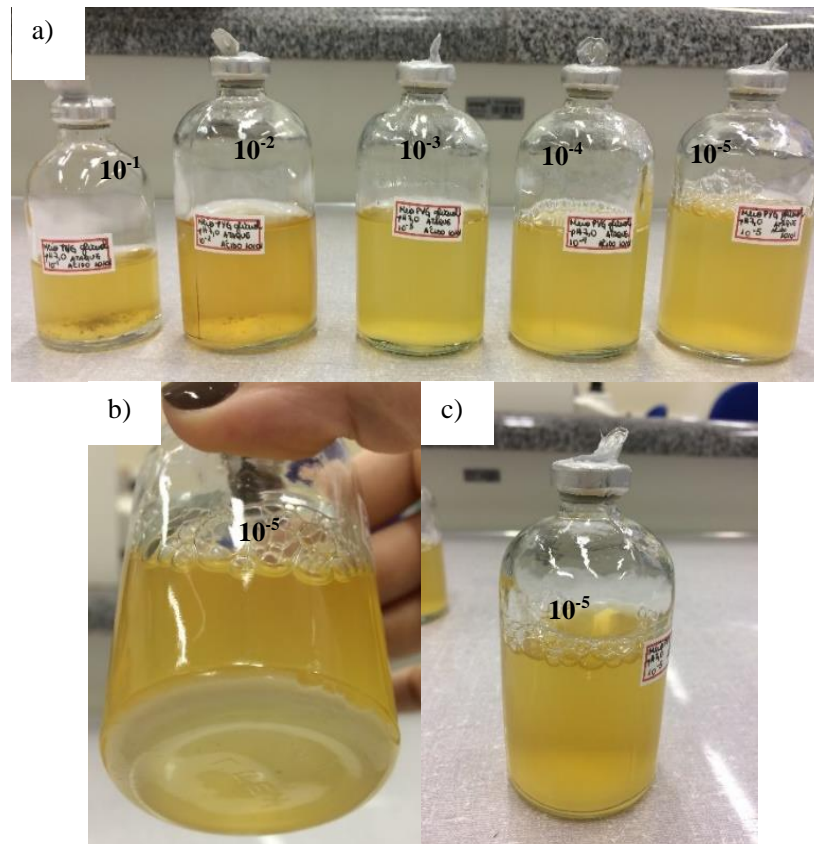
Segundo CHEN et al., (2021), *Clostridium_sensu_stricto_1*, pertencente a ordem Clostridiales, apresenta uma tolerância elevada às condições adversas de cultivo. Além disso, este microrganismo também possui resistência ao ácido e ao calor. Essas características evidenciam a habilidade do *Clostridium_sensu_stricto_1* ter resistido ao pré-tratamento ácido do presente estudo.

Os microrganismos *Pediococcus* e *Enterobacter* se mostraram tolerantes à condição ácida conforme relatado por VASIEE et al., (2020) e como observado no presente estudo de acordo com suas abundâncias relativas encontradas para a amostra 2. MUNFORD; CHAVES; SANT'ANA, (2020) estudaram os parâmetros cinéticos do *Pediococcus damnosus* DSM 20289 e *Pediococcus damnosus* ATCC 29358 a partir da inoculação em leveduras de cerveja submetidos à lavagem ácida para fins de reciclagem da levedura. A lavagem com ácido em pH 1,5 é um método viável para a inativação de contaminantes bacterianos de leveduras de cerveja. Os autores verificaram que *Pediococcus* pôde sobreviver à lavagem ácida feita em pH 2,0 e 1,5.

5.2 Enriquecimento celular do inóculo II

O enriquecimento celular levou à formação de um consórcio responsável pela geração de H₂ e depósito visível da biomassa (Figura 5.2). As diluições seriadas permitiram a purificação da biomassa.

Figura 5.2 - Enriquecimento celular do inóculo II: (a) diluições 10^{-1} a 10^{-5} , (b) biomassa microbiana depositada no fundo do frasco na diluição 10^{-5} e (c) geração de biogás na diluição 10^{-5} com formação de bolhas no meio líquido.



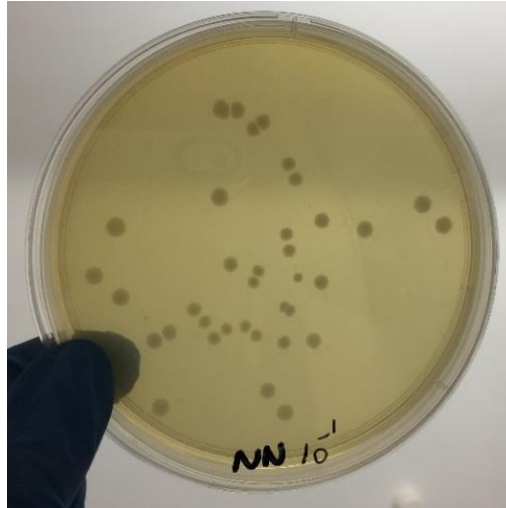
Fonte: Elaboração própria, 2021.

5.3 Contagem das colônias no inóculo II

Na contagem de colônias por técnica de *pourplate*, para o inóculo pré-tratado (diluição 10^{-5}) (SONG et al., 2012) foram quantificadas $3,73 \times 10^3$ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) em meio de cultivo específico para *Clostridium* sp. (Figura 5.3). Esta análise sugeriu que provavelmente *Clostridium* sp. foi o microrganismo predominante no consórcio anaeróbio obtido após o pré-tratamento ácido.

Em relação aos demais plaqueamentos realizados, os meios DHL (Desoxycholate hydrogen sulfide lactose) e VC (Veillonella selective) específicos para *Enterobacteriaceae* sp. e *Veillonella* sp., respectivamente, não formaram colônias, evidenciando provavelmente a ausência destes referidos microrganismos no inóculo pré-tratado. As condições de anaerobiose estrita impostas durante tais plaqueamentos, provavelmente inibiram o favorecimento de colônias nesses meios específicos para bactérias anaeróbias facultativas como *Enterobacter* sp. e *Veillonella* sp. (MAINTINGUER et al., 2008; PACHIEGA et al., 2019b).

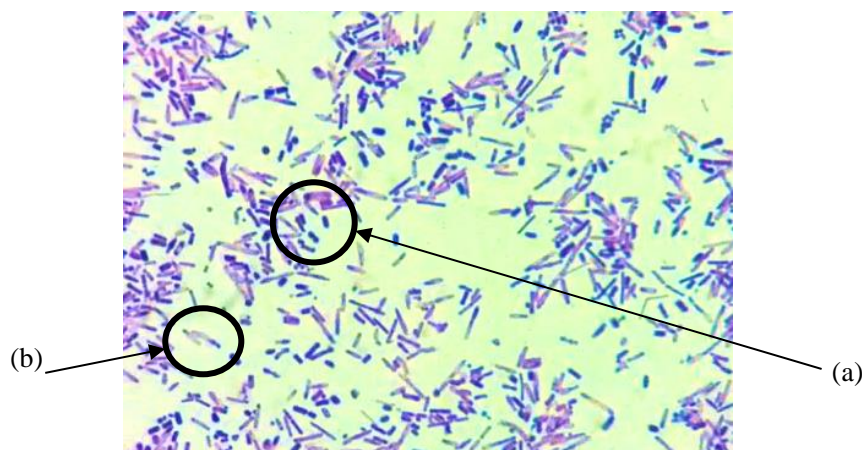
Figura 5.3 - Plaqueamento com o meio Neomycin Nagler do inóculo II pré-tratado na diluição 10^{-5} para quantificação do consórcio anaeróbio gerador de H_2 em meio de cultivo específico para *Clostridium* sp.



Fonte: Elaboração própria, 2021.

Foram diferenciadas células gram-positivas (roxo) em sua maioria e células gram-negativas (rosa) (RIBEIRO; SOARES, 2000) no inóculo pré-tratado por ataque ácido. Bacilos gram-positivos (Figura 5.4) foram observados, correspondendo assim às morfologias predominantes de bactérias envolvidas na geração de H_2 presentes nos consórcios bacterianos, podendo pertencer à espécie *Clostridium* sp. (MAINTINGUER et al., 2011). Entretanto, tal certificação só foi possível com a identificação biomolecular em larga escala, que foi realizada e será apresentada no item 5.4.3.

Figura 5.4 - Análises de microscopia ótica após a purificação celular do inóculo II pré-tratado: (a) predomínio de bacilos gram-positivos e (b) bacilos com endósporos terminais. Ampliação de 1000 X.



Fonte: Elaboração própria, 2021

Assim, o pré-tratamento ácido realizado no presente trabalho foi o responsável por selecionar bactérias anaeróbias geradoras de H₂ com morfologias de bacilos gram-positivos e formadores de endósporos que provavelmente continham populações da espécie *Clostridium* sp., conforme observado por meio do plaqueamento (Figura 5.3) e pela microscopia de coloração de gram (Figura 5.4). O inóculo II foi utilizado para o posterior enriquecimento e montagem dos reatores anaeróbios em batelada.

5.4 Reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais: Fermentação e Metanogênese

5.4.1 Biosistemas Fermentativos (1º Estágio) operados com o inóculo I.

Os valores de DQO analisados nas amostras de afluente e efluente dos reatores foram mantidos constantes, sem remoção de matéria orgânica no 1º Estágio (Tabela 5.2), confirmando o metabolismo do glicerol na presença de bactérias fermentativas (*Clostridium* sp.). Essa evidência comprovou a transformação do substrato inicial a ácidos orgânicos e álcoois que permaneceram na fase líquida causando a manutenção da DQO ao longo dos ensaios (RODRIGUES et al., 2019a).

Para os ensaios envolvendo a codigestão (Ensaio 1 a 5), houve a remoção de ambos os resíduos, glicerol bruto e glicose (proveniente da VC) (Tabela 5.2 e Figura 5.5 a e b). As concentrações de glicerol removidas (93,19 % para ensaio 1; 95,95 % para ensaio 2; 91,11 % para ensaio 3 e 97,92 % para ensaio 4) foram superiores às remoções de glicose (74,00 % para ensaio 1; 51,40 % para ensaio 2; 70,42 % para ensaio 3 e 67,78 % para ensaio 4), já que, previamente aos ensaios, o inóculo era reativado em meio PYG modificado pela adição de glicerina ao invés de glicose (Tabela 4.1), condicionando assim os microrganismos neste substrato, facilitando sua remoção perante a glicose proveniente da vinhaça. Esses resultados confirmaram que o consórcio microbiano presente no inóculo I favoreceu a remoção do glicerol quando comparado à glicose.

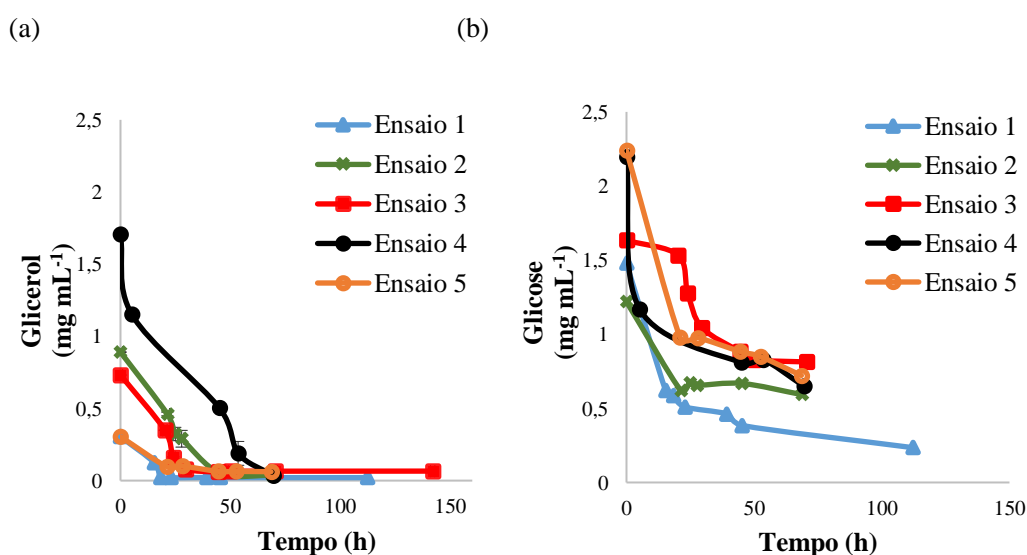
Tabela 5.2 - Resultado da operação no 1º estágio (fermentação) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.

Parâmetros	Condições								
	Controle 1	Ensaio 1	Controle 2	Ensaio 2	Controle 3	Ensaio 3	Controle 4	Ensaio 4	Ensaio 5
Tempo de operação dos reatores (h)	112,30	112,30	68,80	68,80	142,00	142,00	69,50	69,50	68,50
Remoção de glicerol (%)	98,01	93,19	95,50	95,95	67,82	91,11	43,46	97,92	79,65
Remoção de glicose (%)	-	74,00	-	51,40	-	31,51	-	70,42	67,78
DQO Inicial (g L ⁻¹)	19,87	21,19	19,89	24,92	23,60	28,23	31,82	38,07	22,40
DQO Final (g L ⁻¹)	19,60	22,12	18,57	24,79	24,92	28,76	30,78	37,55	22,32
pH Inicial	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50
pH Final	5,74	5,55	4,90	4,90	4,81	4,75	4,86	4,53	4,80
Geração etanol (mg L ⁻¹)	-	-	-	20,00	-	6,00	-	18,00	11,00
Geração ácido acético (mg L ⁻¹)	166,00	418,00	143,00	204,00	193,00	222,00	136,00	300,00	138,00
Geração ácido butírico (mg L ⁻¹)	77,00	90,00	168,00	118,00	9,00	8,00	9,00	9,00	9,00
Geração ácido propiônico (mg L ⁻¹)	56,00	71,00	233,00	135,00	50,00	51,00	56,00	47,00	47,00
Geração máxima de 1,3-PD (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	497,00	702,00	850,00	1916,0	113,00
Geração máxima de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	-	4,48	2,36	22,71	-	-	-	-	-
Rm (mmol L ⁻¹ cultura. h)	-	0,78	0,39	2,23	-	-	-	-	-
L (h)	-	13,43	19,05	19,21	-	-	-	-	-

Ensaio 1: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBR + 5 g DQO L⁻¹ VC); Controle 1: 5 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 2: 20 g DQO L⁻¹ (10 g DQO L⁻¹ GBR + 10 g DQO L⁻¹ VC); Controle 2: 10 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 3: 30 g DQO L⁻¹ (15 g DQO L⁻¹ GBR + 15 g DQO L⁻¹ VC); Controle 3: 15 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 4: 40 g DQO L⁻¹ (20 g DQO L⁻¹ GBR + 20 g DQO L⁻¹ VC); Controle 4: 20 g DQO L⁻¹ GBR e Ensaio 5: 40 g DQO L⁻¹ (10 g DQO L⁻¹ GB + 30 g DQO L⁻¹ VC); GBR: glicerol bruto do tratamento de óleos residuais domésticos e VC: vinhaça citrícola.

Trabalhos na literatura envolvendo a geração de H_2 mediante à codigestão glicerol/glicose são inexistentes. Todavia, alguns trabalhos relatam a geração de CH_4 durante a codigestão destes dois substratos. SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, (2019) realizaram a codigestão glicerol/glicose para aumentar a geração de CH_4 a partir de um lodo granular de reator UASB usado para o tratamento de resíduos da mandioca. Diferentemente do presente estudo, os autores concluíram que a glicose foi o substrato mais favorável, sendo removido em elevadas proporções quando comparado ao glicerol. Isso se deveu ao fato de o consórcio não ter sido submetido à uma fase antecedente de adaptação e reativação em glicerina, como no caso do presente estudo, o que conferiu essa diferença de preferência por remoção da glicose comparado ao glicerol.

Figura 5.5 - Variação temporal das remoções de glicerol (a) e glicose (b) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.



Ensaio 1: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBR + 5 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 2: 20 g DQO L⁻¹ (10 g DQO L⁻¹ GBR + 10 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 3: 30 g DQO L⁻¹ (15 g DQO L⁻¹ GBR + 15 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 4: 40 g DQO L⁻¹ (20 g DQO L⁻¹ GBR + 20 g DQO L⁻¹ VC) e Ensaio 5: 40 g DQO L⁻¹ (10 g DQO L⁻¹ GB + 30 g DQO L⁻¹ VC); GBR: glicerol bruto e VC: vinhaça citrícola. GBR: glicerol bruto do tratamento de óleos residuais domésticos e VC: vinhaça citrícola.

A remoção de glicerol nos ensaios 3 e 4 poderia ter sido comprometida, tendo em vista que este substrato estava presente em concentrações elevadas, o que aumentou assim a carga orgânica e quantidade de tóxicos (metanol e sabão) presentes no GBR, que poderiam ter interferido na atividade microbiológica, como relatado por alguns autores como RODRIGUES et al., (2017) e SARMA et al., (2012). Porém, para estes referidos ensaios, a codigestão possibilitou a elevada remoção do glicerol (Tabela 5.2), sendo 91,11 % para o ensaio 3 e 97,92

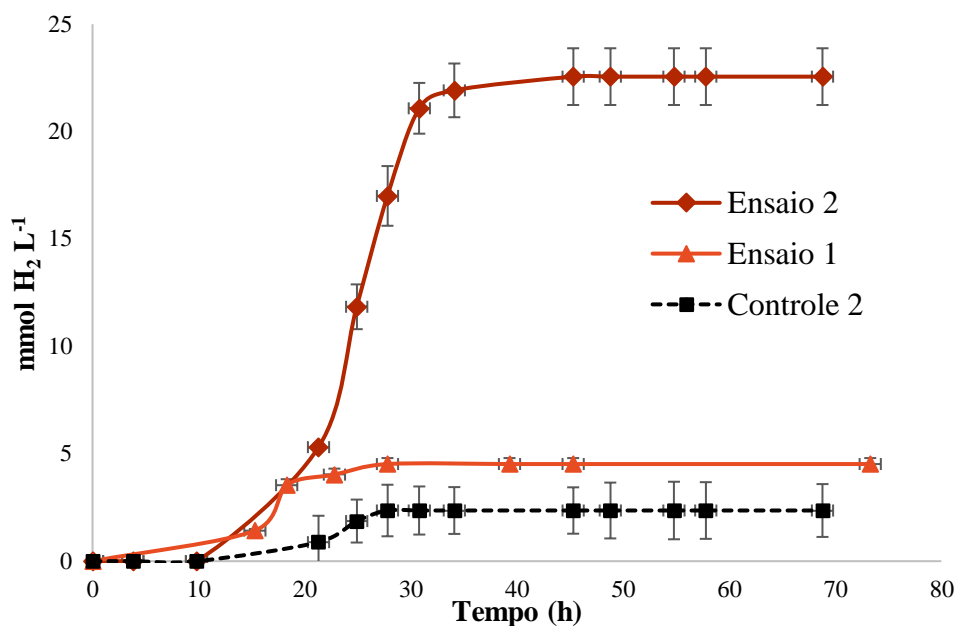
% para o ensaio 4. O processo de codigestão favoreceu a remoção do glicerol quando este estava presente em concentrações elevadas nos ensaios. Porém, nos referidos controles onde havia apenas o glicerol bruto, somente 31,51 % de glicerol foi consumido no controle 3 e 70,42 % no controle 4, ambos na ausência de glicose. Nesse caso foi confirmado o efeito sinérgico da codigestão anaeróbia em termos de consumo de substrato. Além disso, a presença de glicose e macro e micronutrientes da VC, além de diluir os componentes tóxicos presentes no GBR, facilitaram o seu consumo (ASTALS; NOLLA-ARDEVOL; MATA-ALVAREZ, 2013; KURAHASHI et al., 2017).

Para os ensaios 1 e 2 bem como para os seus respectivos controles (controles 1 e 2), as remoções de glicerol foram acentuadas, sendo 93,19 %, 98,01 %, 95,95 % e 95,50 % para o ensaio 1, controle 1, ensaio 2 e controle 2 (Tabela 5.2), respectivamente, já que foram operados sob concentrações reduzidas de glicerol bruto, tendo sua remoção facilitada. Além disso, nesses casos, a presença de contaminantes advindos desse GBR foi reduzida e, portanto, não inibitória às atividades microbiológicas.

O ensaio 5 foi monitorado a fim de se avaliar a influência do aumento da concentração de VC frente à uma baixa concentração de GBR. O aumento da VC não facilitou a remoção de glicerol, sendo removido apenas 79,65 %, valor este mais reduzido para os ensaios de codigestão operados. Assim como o GBR, a VC, além de ser rica em açúcares, possui também uma elevada concentração de impurezas como compostos químicos recalcitrantes como fenol, furfural e melanoidina, que poderiam ter inibido a atividade microbiana no presente estudo, justificando a reduzida remoção de substratos (TORQUATO et al., 2017). De acordo com LIU et al., (2019), furfural e fenol apresentam elevada toxicidade que interferem diretamente na rota metabólica microbiana, o que poderiam ter gerado um efeito retardante na remoção de glicerol no presente estudo.

Estudos reportaram que a codigestão do glicerol bruto com outros resíduos tais como esgoto sanitário e estrume de porco, por exemplo, foi usada como estratégia para o aumento da geração de biogás (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014). Entretanto, apenas os ensaios 1 e 2 geraram H_2 , 4,48 mmol $H_2 L^{-1}$ e 22,71 mmol $H_2 L^{-1}$, respectivamente, durante o processo de codigestão (Tabela 5.2 e Figura 5.6). Quanto aos controles 1 e 2, não houve geração de H_2 no controle 1 e apenas 2,36 mmol $H_2 L^{-1}$ foi gerado no controle 2. Assim, foi possível inferir que a codigestão facilitou a geração de H_2 para ambos os ensaios.

Figura 5.6 - Geração de H_2 ($mmol L^{-1}$) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo I a $37\text{ }^\circ\text{C}$.



Ensaio 1: 10 g DQO L^{-1} (5 g DQO L^{-1} GBR + 5 g DQO L^{-1} VC); Ensaio 2: 20 g DQO L^{-1} (10 g DQO L^{-1} GBR + 10 g DQO L^{-1} VC); Controle 2: 10 g DQO L^{-1} GBR. GBR: glicerol bruto do tratamento de óleos residuais domésticos e VC: vinhaça citrícola.

Para concentrações elevadas de substratos não houve geração de H_2 (ensaio e controle 3, ensaio e controle 4 e ensaio 5) (Tabela 5.2). Por outro lado, foram registradas gerações de 1,3-PD tanto para os ensaios de codigestão (ensaio 3: $702\text{ mg 1,3-PD L}^{-1}$, ensaio 4: $1916\text{ mg 1,3-PD L}^{-1}$ e ensaio 5: $113\text{ mg 1,3-PD L}^{-1}$) quanto para os controles (controle 3: $497\text{ mg 1,3-PD L}^{-1}$ e controle 4: 850 mg L^{-1}) (Tabela 5.2). O metabolismo fermentativo do glicerol pode ocorrer pelas rotas oxidativa, quando há a conversão do glicerol a H_2 juntamente com a produção de lactato, acetato, butirato, butanol, etanol, 2,3-butanodiol e propionato, por exemplo e, a redutiva, quando há a conversão à 1,3-PD. Essas rotas podem ocorrer concomitantemente no mesmo microrganismo. Assim, 1,3-PD e H_2 correspondem aos produtos majoritários que podem ser gerados durante a bioconversão do glicerol. Contudo, para que 1 mol de 1,3-PD seja gerado, 1 mol de H_2 é consumido, reduzindo desta forma o rendimento de H_2 com a produção de 1,3-PD (RODRIGUES et al., 2019a). Logo, para os ensaios e controles com concentrações elevadas de substratos, a geração de 1,3-PD foi favorecida.

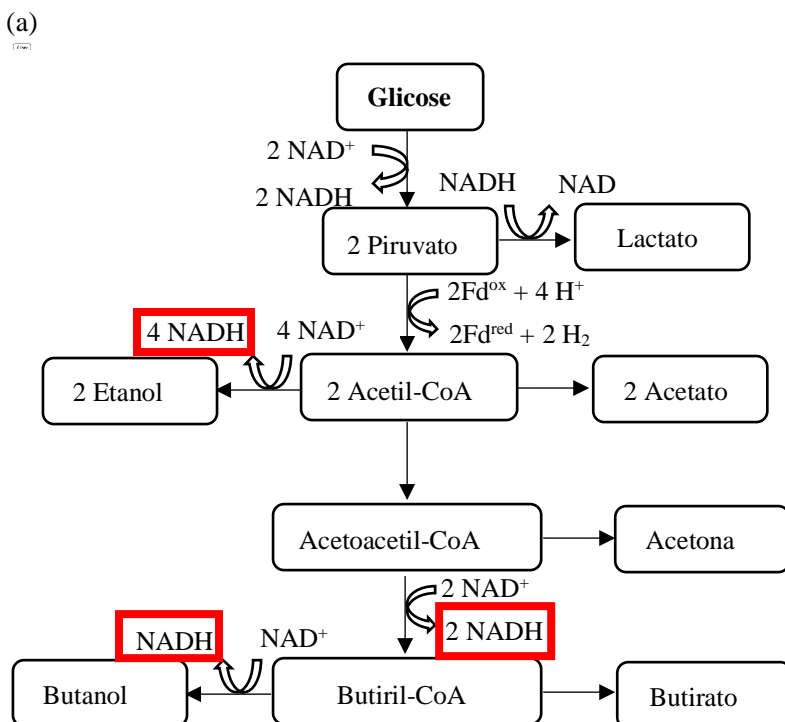
O favorecimento da rota redutiva para os ensaios 3, 4 e 5 e para os controles 3 e 4 se deveu à concentração elevada do GBR aplicada. Estudos relataram que as impurezas presentes no glicerol bruto podem favorecer a geração de 1,3-PD (SAMUL; LEJA; GRAJEK, 2014). Assim, quando houve uma concentração elevada de glicerol nos processos fermentativos,

aumentaram-se dessa forma as concentrações de impurezas. JUN et al., (2010) avaliaram a produção de 1,3-PD comparando-se o uso de glicerol bruto e glicerol puro na presença de *Klebsiella pneumoniae* DSM 4799. Os ensaios anaeróbios em batelada com 40 g L⁻¹ de glicerol revelaram que após 69 horas de incubação, as concentrações de 1,3-PD com glicerol bruto foram maiores do que os ensaios com o glicerol puro, sendo gerados 80,2 g 1,3-PD L⁻¹ e 63,3 g 1,3-PD L⁻¹, respectivamente, sendo relatado um aumento de 27 % na produção. Segundo SAMUL; LEJA; GRAJEK, (2014), isso se deveu ao fato de o glicerol bruto ser um resíduo rico em vitaminas e outros fatores nutricionais que poderiam, desta forma, terem sido usados pelas bactérias, resultando numa atividade metabólica elevada e até mesmo o favorecimento para a rota redutiva, justificando as gerações de 1,3-PD para os ensaios contendo concentrações elevadas de glicerol bruto no presente estudo.

Outro fator observado foi a concentração de 1,3-PD ser elevada para o ensaio 3 (702 mg L⁻¹), por exemplo, quando comparado ao seu respectivo controle 3 (497 mg L⁻¹), similarmente no ensaio 4 (1915 mg L⁻¹) com seu respectivo controle 4 (850 mg L⁻¹). Segundo SUN et al., (2018), no caso de processos envolvendo a codigestão de glicose e glicerol, microrganismos como o *Clostridium butyricum* podem usar a glicose para produzir bioenergia, enquanto que o glicerol é usado principalmente para a redução de equivalentes que irão formar o 1,3-PD na rota redutiva do metabolismo. Assim, durante a codigestão de ambos os substratos, a conversão do glicerol a 1,3-PD pode ser completa sob condições anaeróbias na presença de glicose. Portanto, quando há a codigestão do glicerol com glicose, as concentrações de 1,3-PD tendem a aumentar (OH et al., 2013; SUN et al., 2018). A mistura de glicerol com alguns açúcares tem sido usado como estratégia para aumentar a produção de 1,3-PD (SAXENA et al., 2009; XIU et al., 2007). Isso justificou o fato dos ensaios 3 e 4 apresentarem gerações mais elevadas de 1,3-PD por se tratar de codigestão envolvendo o glicerol e a glicose; diferentemente do que foi observado nos controles 3 e 4, onde havia somente o glicerol, ocasionando gerações reduzidas de 1,3-PD.

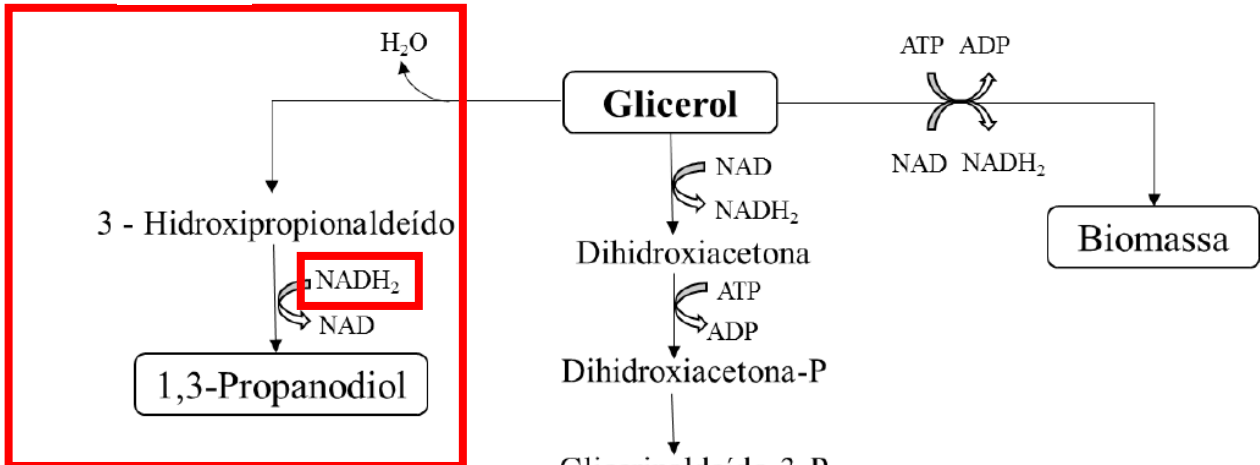
De acordo com VIVEK; PANDEY; BINOD, (2016) vários microrganismos do gênero *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Enterobacter*, por exemplo, são reportados como produtores de 1,3-PD através do glicerol. Estes microrganismos são conhecidos como heterofermentativos, que podem utilizar ao mesmo tempo a glicose e o glicerol no seu metabolismo. A geração de 1,3-PD depende principalmente do fluxo de moléculas NADH (VIVEK et al., 2017). A figura 5.7 ilustra o mecanismo metabólico possivelmente adotado durante a codigestão de glicose-glicerol pelos microrganismos pertencentes à família *Clostridiaceae* identificada no inoculo I.

Figura 5.7 - Rotas metabólicas para a cofermentação glicose-glicerol na codigestão (a) fermentação da glicose, (b) rota redutiva do glicerol e (c) rota oxidativa do glicerol.

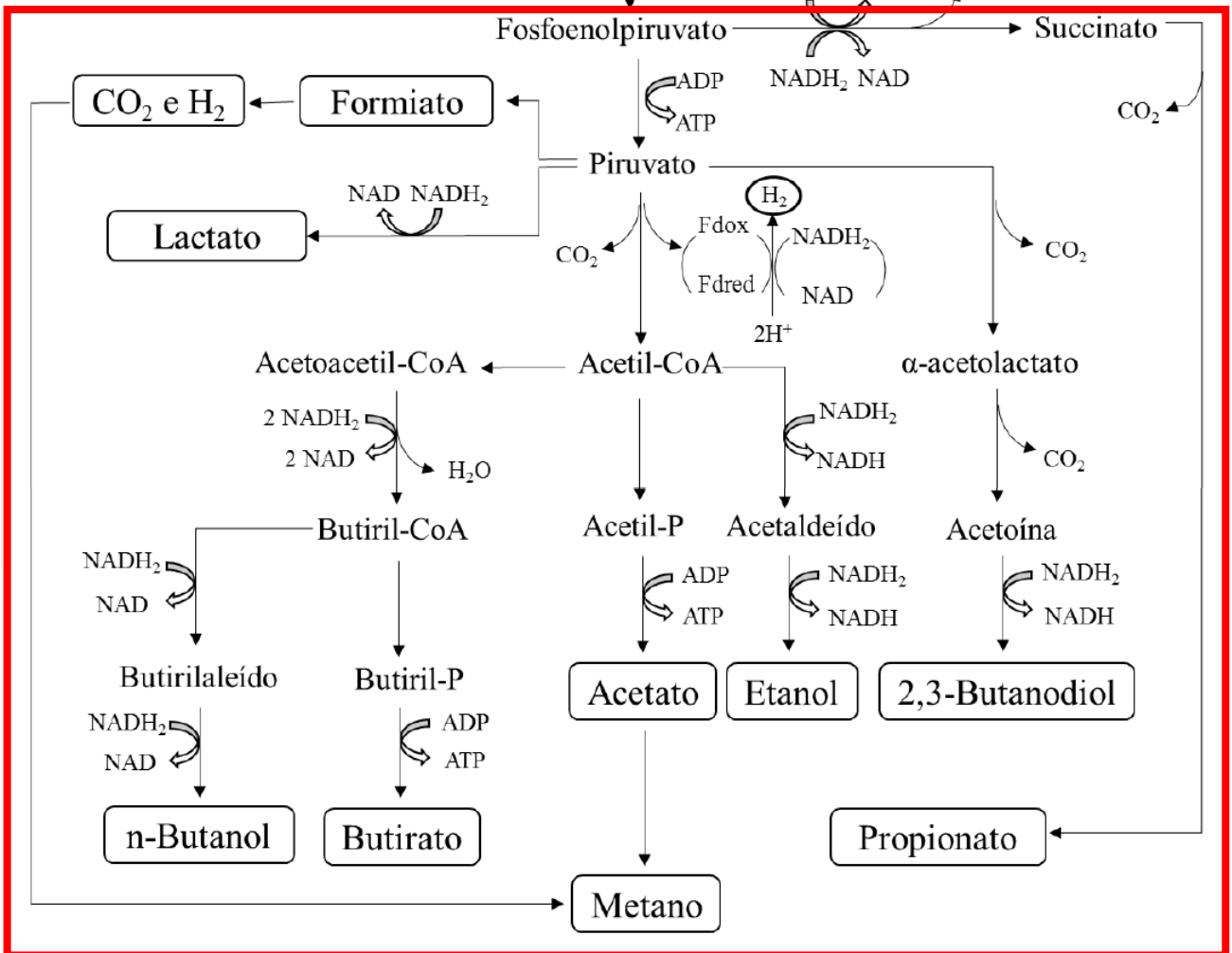


Fonte: Modificado SARMA et al., (2012).

(b)



(c)



Fonte: SIMÕES, (2017)

A remoção do açúcar na codigestão promoveu a geração nas primeiras horas de ácidos e álcoois provenientes dessa fermentação (Figura 5.7 a). O glicerol foi provavelmente degradado primeiramente em rota redutiva (Figura 5.7 b) pela enzima glicerol desidratase envolvendo sua redução a 3-hidroxi propionaldeído, sendo este tóxico para a célula microbiana, onde foi prontamente reduzido a 1,3-PD pelo NADH fornecido durante a rota de oxidação da glicose (Figura 5.7 a). Se a glicose foi completamente removida, a rota oxidativa do glicerol poderia ter sido ativada para produzir ATP e NADH (Figura 5.7 c) (PINTO; PASTERIS; SAAD, 2004; VIVEK et al., 2017). Este mecanismo provavelmente ocorreu nos ensaios realizados para o inóculo I com gerações de 1,3-PD verificadas.

Os ensaios de 1 a 5 bem como seus respectivos controles foram operados com o inóculo I, que foi identificado em trabalhos anteriores (RODRIGUES et al., 2019a) por bactérias pertencentes à ordem Clostridiales. Assim, estes microrganismos tanto são conhecidos por gerar H_2 a partir do glicerol bruto como por serem responsáveis pela produção de 1,3-PD. De acordo com APIWATANAPIWAT et al., (2018), *C. butyricum* e *C. diolis* são consideradas como bons produtores de 1,3-PD. Desse modo, o *Clostridium* sp. converteu o glicerol a 1,3-PD anaerobiamente através da via biossintética independente da coenzima B12.

Ainda segundo os autores, a suplementação do meio reacional contendo glicerol com glicose deve aumentar tanto o crescimento quanto a geração de 1,3-PD. Quando adicionados como cosubstratos, os açúcares glicose, sacarose, maltose e xilose reforçam a conversão de 1,3-PD a partir de glicerol. Porém, o excesso de açúcares pode diminuir a produtividade de 1,3-PD porque a glicose liberada da degradação do substrato utilizado para suplementação se torna suficiente para reprimir o metabolismo do glicerol a 1,3-PD (APIWATANAPIWAT et al., 2018). Como visto no presente estudo pelo ensaio 5 que continha 10 g DQO L^{-1} de GBR e 30 g DQO L^{-1} de VC, onde o excesso de glicose proveniente deste substrato provocou a geração mais reduzida de 1,3-PD (113 mg L^{-1}) quando comparados com os outros ensaios que tinham concentrações menores de vinhaça. Assim, embora o cosubstrato seja um importante influenciador dos rendimentos de produção de 1,3-PD, alguns cosubstratos contêm fontes de carbono que iniciam a repressão catabólica na geração de 1,3-PD por bactérias anaeróbias pertencentes à espécie *Clostridium* sp.

5.4.2 Biosistemas Metanogênicos (2º Estágio) operados com o inóculo I.

Os efluentes gerados após o 1º estágio (fermentação) foram usados como substratos para os ensaios metanogênicos do 2º estágio. Além disso, os substratos remanescentes do 1º estágio (glicerol e glicose) foram ainda mais removidos no segundo estágio pelos microrganismos presentes no inóculo II *in natura* (amostra 1). Nesse caso foram verificadas remoções do glicerol remanescente em 88,36 %, 86,32 %, 86,45 %, 87,71 % e 93,50 % para os ensaios 1', 2', 3', 4' e 5', respectivamente (Tabela 5.3). Fato semelhante foi observado para as remoções de glicose remanescente em 83,13 %, 93,61 %, 95,88 %, 89,91 % e 93,49 % nos respectivos ensaios 1', 2', 3', 4' e 5'. Entretanto, as remoções do glicerol remanescente nos controles foram menores (64,18 %, 59,00 %, 70,50 % e 70,40 % para os controles 1', 2', 3' e 4', respectivamente), confirmando que a codigestão facilitou a remoção do glicerol, quando comparados os ensaios com os controles.

A montagem de reatores em fases sequenciais permitiu que o processo anaeróbio fosse superior do que um único processo, porque não apenas forneceu a geração de biogás adicional, como o CH₄, mas também produziu efluentes com valores de DQO inferiores, levando a custos reduzidos para processos de pós-tratamento (TANGKATHITIPONG et al., 2017). Redução significativa dos valores de DQO nos ensaios e controles foi verificada (Tabela 5.3). Assim, no primeiro estágio a DQO foi mantida devido ao processo de fermentação e, no segundo estágio houve a remoção de matéria orgânica, onde a redução do carbono se deu devido à geração de CH₄ na fase gasosa. Quando houve um aumento na carga orgânica, dada pelos ensaios 3' e 4', a remoção de matéria orgânica foi mais expressiva (89,10 % e 83,34 %, respectivamente) quando comparada aos respectivos controles 3' e 4' (50,58 % e 49,50 %, respectivamente). Novamente, cabe inferir que com a codigestão, a remoção de DQO foi superior nos ensaios realizados. Assim, o segundo estágio funcionou como um pós-tratamento do efluente do primeiro estágio.

Tabela 5.3 - Resultado da operação no 2º estágio (metanogênese) para os efluentes da codigestão do GBR com VC nos ensaios operados em batelada com o inóculo II a 37 °C.

Parâmetros	Condições								
	Controle 1'	Ensaio 1'	Controle 2'	Ensaio 2'	Controle 3'	Ensaio 3'	Controle 4'	Ensaio 4'	Ensaio 5'
Tempo de operação dos reatores (h)	624,00	624,00	887,50	887,50	813,50	813,50	837,00	837,00	721,50
Remoção de glicerol remanescente (%)	64,18	88,36	59,00	86,32	70,50	86,45	70,40	87,71	93,50
Remoção de glicose remanescente (%)	-	83,13	-	93,61	-	95,88	-	89,91	93,49
Remoção de DQO (%)	88,85	87,34	74,80	85,65	50,58	89,10	49,50	83,34	89,58
pH Inicial	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
pH Final	8,03	8,30	8,00	8,20	8,00	8,23	8,01	8,20	8,19
Remoção de metanol (%)	80,00	93,75	85,00	100,00	87,00	98,88	89,00	100,00	100
Geração máxima de CH₄ (mmol CH₄ L⁻¹)	40,58	229,08	35,89	318,65	33,71	275,87	36,97	355,45	287,67

Ensaio 1': Efluente do Ensaio 1; Controle 1': Efluente do Controle 1; Ensaio 2': Efluente do Ensaio 2; Controle 2': Efluente do Controle 2; Ensaio 3': Efluente do Ensaio 3; Controle 3': Efluente do Controle 3; Ensaio 4': Efluente do Ensaio 4; Controle 4': Efluente do Controle 4 e Ensaio 5': Efluente do Ensaio 5.

O acetato que foi gerado nos ensaios no 1º estágio (Tabela 5.2) foi removido no 2º estágio por arqueias metanogênicas acetoclásticas. Segundo KURADE et al., (2019), a metanogênese acetoclástica é considerada como a principal rota pelo qual o CH₄ é gerado. Atualmente, somente dois gêneros de arqueias metanogênicas, *Methanosaeta* e o *Methanosarcina* são conhecidos por realizar a metanogênese acetoclástica. Além disso, ambos foram identificados no inóculo II *in natura* (amostra 1) (Figuras 5.8 e 5.9) apresentando 26 % de abundância relativa de *Methanosaeta* dentro do filo das Arquéias (o que representou 2,02 % da população microbiana total) e 18,00 % de abundância relativa de *Methanosarcina* (1,37 % da população microbiana total). Arqueias pertencentes ao gênero *Methanosaeta* são consumidoras obrigatórias de acetato; entretanto, as do gênero *Methanosarcina* são

consórcio misto. Os gêneros encontrados no lodo granular foram *Sporosarcina* (20 %) (filo Firmicutes), *Proteiniphilum* (11 %) (filo Bacteroidetes), *Methanosarcina* (8 %) (filo Euryarchaeota), *Lutaonella* (7 %) (filo Bacteroidetes) e *Aminobacterium* (6 %) (filo Synergistetes). Segundo os autores, alguns dos gêneros pertencentes a estes filos mencionados realizam acetogênese e transporte de elétrons interespecies na forma de hidrogênio ou formato em interações sintróficas com microrganismos metanogênicos. Essas bactérias oxidam ácidos graxos voláteis e álcoois em ácido acético, H₂ e dióxido de carbono na acetogênese, que são simultaneamente convertidos em CH₄ por arqueias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas.

Similarmente ao trabalho de Kurade e autores (2020), também foram encontrados no presente estudo, para a amostra 1 (inóculo II *in natura*), os gêneros: *Aminobacterium* (6,42 %), *Proteiniphilum* (1 %), *Syntrophomonas* (1,10 %), além de *Gelria* (1,13 %), *Fastidiosipila* (3,38 %), *Proteinclasticum* (1,00 %), *Candidatus_Cloacamonas* (3,04 %), *Macellibacteroides* (2,29 %), *Petrimonas* (2,36 %), *Paenalcaligenes* (2,21 %), *Pseudomonas* (2,12 %) e *Lutispora* (1,03 %).

As bactérias pertencentes ao gênero *Aminobacterium* utilizam com eficácia numerosos aminoácidos, produzindo assim uma variedade de ácidos graxos voláteis e amônia, especialmente na presença de *Methanobacterium* (hidrogenotrófica) que age como um sequestrante de hidrogênio (KURADE et al., 2020). No presente estudo, os meios de cultivo que integraram os ensaios 1', 2', 3', 4' e 5' continham compostos nitrogenados como o extrato de carne, extrato de levedura e peptona de carne. Assim, estes compostos foram as fontes de aminoácidos para bactérias do gênero *Aminobacterium* que poderiam ter consumido e gerado substratos numa condição sintrófica com microrganismos metanogênicos.

O gênero *Proteiniphilum* pode fermentar substratos orgânicos, como no caso do presente estudo poderiam estar incluídos os substratos remanescentes como o glicerol do GBR e açúcares da VC, por exemplo, para gerar acetato, isobutirato, ácido propiônico, isovalerato e dióxido de carbono e assim, o acetato poderia ter sido utilizado por microrganismos metanogênicos (KURADE et al., 2020).

Syntrophomonas é um dos gêneros mais importantes necessários para o metabolismo dos ácidos graxos de cadeias longas. Oxidantes de ácidos graxos sintróficos e em associação de arqueias metanogênicas, catalisam os ácidos graxos de cadeias longas em CH₄ por meio de várias etapas, evitando também o seu acúmulo inibitório. Os oxidantes de ácidos graxos sintróficos e metanogênicos prosperam em uma relação simbiótica, porque o primeiro grupo produz acetato e H₂ e o último consome esses produtos para produzir CH₄ (KURADE et al.,

2020). Assim como as *Syntrophomonas*, a *Gelria*, encontrada no presente estudo, também é conhecida por oxidar os ácidos graxos de cadeia longa e assim construir uma relação sintrófica com microrganismos metanogênicos (MA et al., 2020). Dessa forma, no presente estudo, os ácidos graxos estavam ainda presentes no glicerol bruto remanescentes devido à reação de transesterificação incompleta (dada pelo elevado teor de MONG – seção 4.1), que poderiam então terem sido removidos pelas *Syntrophomonas* e *Gelria*, gerando acetato que foram utilizados por microrganismos metanogênicos numa reação sintrófica, gerando CH₄.

Ainda nessa relação sintrófica, *Fastidiosipila*, encontrada o presente estudo, pertence à classe Clostridia, que são produtores eficientes de H₂, podendo também transformar os substratos de proteínas e carboidratos em ácidos orgânicos como butírico e acético (WANG et al., 2020b). Assim como *Fastidiosipila*, microrganismos do gênero *Proteiniclasticum* também são conhecidos por consumir proteínas, levando à formação de ácidos propiônico e acético (HOANG et al., 2021; YIN et al., 2017, 2018).

Candidatus_Cloacamonas pertence ao filo *Cloacimonete* e pode produzir CO₂ e H₂ a partir de diversos substratos de fermentação (SHEN et al., 2021). Eles foram relatados como tendo a capacidade de metabolizar substratos orgânicos complexos, com a produção de hidrogênio e cooperar com microrganismos metanogênicos (LI et al., 2019; YAN et al., 2021). Assim, no presente estudo, para os reatores em segundo estágio dos biosistemas integrados, a presença de *Candidatus_Cloacamonas* nestes reatores anaeróbios foi de extrema importância para a metanogênese, proporcionando assim a geração de CH₄.

Macellibacteroides pertence à família Porphyromonadaceae e ao filo Bacteroidetes, sendo caracterizado por metabolizar monossacarídeos e dissacarídeos para produzir lactato, acetato, butirato e isobutirato (AMIN et al., 2020; LIAO et al., 2020). Dessa forma, glicose, frutose e sacarose no presente estudo, advindos da VC, provavelmente foram removidas por estes microrganismos, melhorando, portanto, a produção de CH₄ tanto na segunda fase dos biosistemas integrados quanto do reator de escala aumentada, já que microrganismos metanogênicos acetoclásticos, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, encontrados no presente estudo, poderiam ter feito a remoção do acetato gerado durante a degradação destes compostos (GUO et al., 2019).

Petrimonas pertencem ao filo Bacteroidetes, sendo conhecidos por fermentar carboidratos em produtos intermediários, como ácido acético e hidrogênio. Em geral, a abundância de bactérias hidrolíticas, como *Petrimonas*, e arqueias como *Methanosarcina* em digestores anaeróbios tendem a aumentar a produção de CH₄, já que eles estão em uma cadeia sintrófica (ZEB et al., 2019). Conforme observado no presente estudo, estes dois

microrganismos foram encontrados, o que caracteriza a habilidade de ter a geração de gás metano aumentada para os reatores em codigestão.

Lutispora está relacionada à hidrólise da lignocelulose, estando intimamente ligada à geração de CH₄ devido aos efeitos sintróficos mediante à geração de acetato (CAI et al., 2021; ZHU et al., 2021).

Dessa forma, todos os microrganismos identificados fizeram parte das interações sintróficas com as arqueias metanogênicas na amostra 1. Além dos microrganismos metanogênicos encontrados para essa amostra como as acetocláticas *Methanosaeta* e *Methanosarcina* e as hidrogenotróficas *Methanobacterium*, *Methanoculleus* e *Methanoregula*, a presença das bactérias acetogênicas (*Aminobacterium*, *Proteiniphilum*, *Syntrophomonas*, *Gelria*, *Fastidiosipila*, *Proteiniclasticum*, *Candidatus_Cloacamonas*, *Macellibacteroides*, *Petrimonas*, *Paenalcaligenes*, *Pseudomonas* e *Lutispora*) permitiu a elevação de CH₄ para os ensaios no segundo estágio da codigestão (Tabela 5.3). Segue abaixo o resumo das relações sintróficas entre bactérias e arqueias identificadas no inóculo II *in natura* (Tabela 5.4).

O metanol representa umas das principais impurezas presentes no glicerol bruto, de difícil remoção pelos microrganismos, podendo ser tóxico para as atividades microbiológicas além de apresentar riscos ambientais quando descartado de forma inadequada (RODRIGUES et al., 2019a). O metanol foi removido em porcentagens elevadas (93,75 % ensaio 1', 80,00 % controle 1', 85,00 % controle 2', 98,88 % ensaio 3', 87,00 % controle 3' e 89,00 % controle 4') ou completamente (ensaio 2', ensaio 4' e ensaio 5') nos ensaios realizados. Logo, a montagem de reatores em dois estágios permitiu a remoção do metanol do efluente dos reatores fermentativos (1º estágio), originando um efluente livre deste composto tóxico (2º estágio).

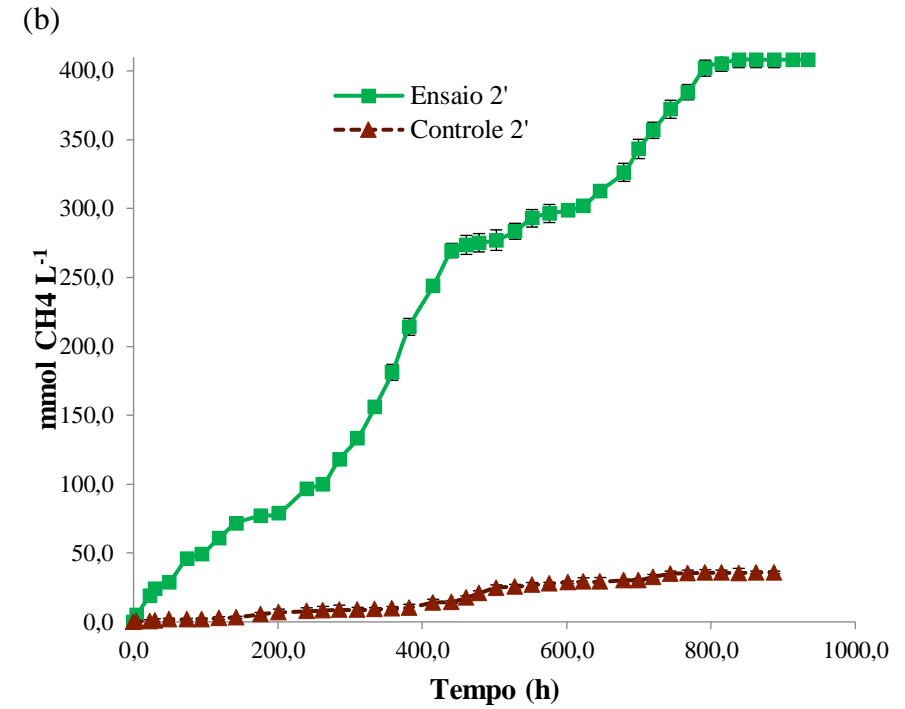
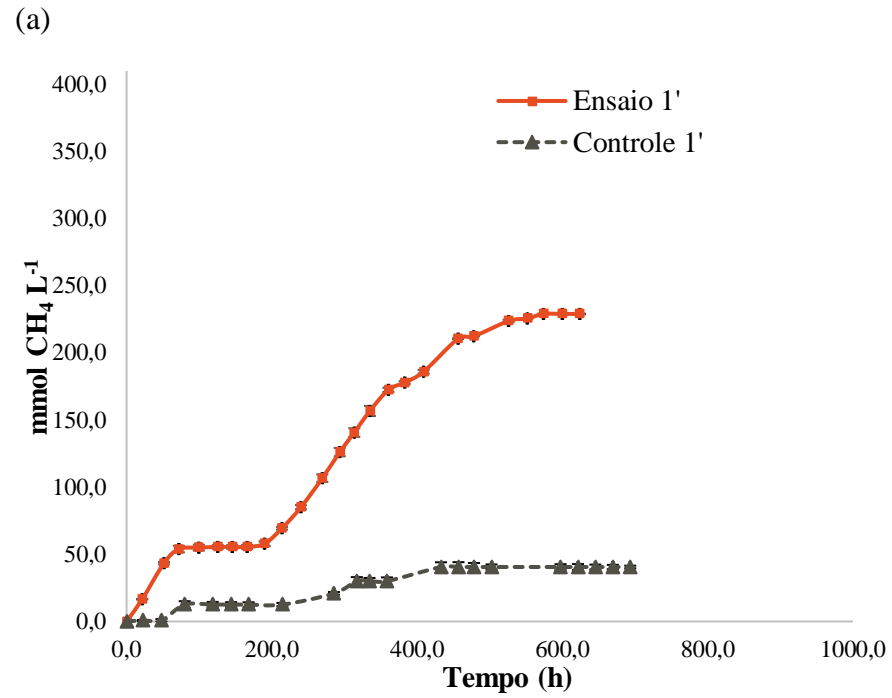
O pH ao final da operação dos reatores foi superior (próximo de 8) quando comparado ao início dos ensaios (pH 7,00) (Tabela 5.3). Segundo BABA et al., (2013), quando ácidos graxos voláteis são consumidos, ocorre o aumento do pH, conforme verificado no presente estudo.

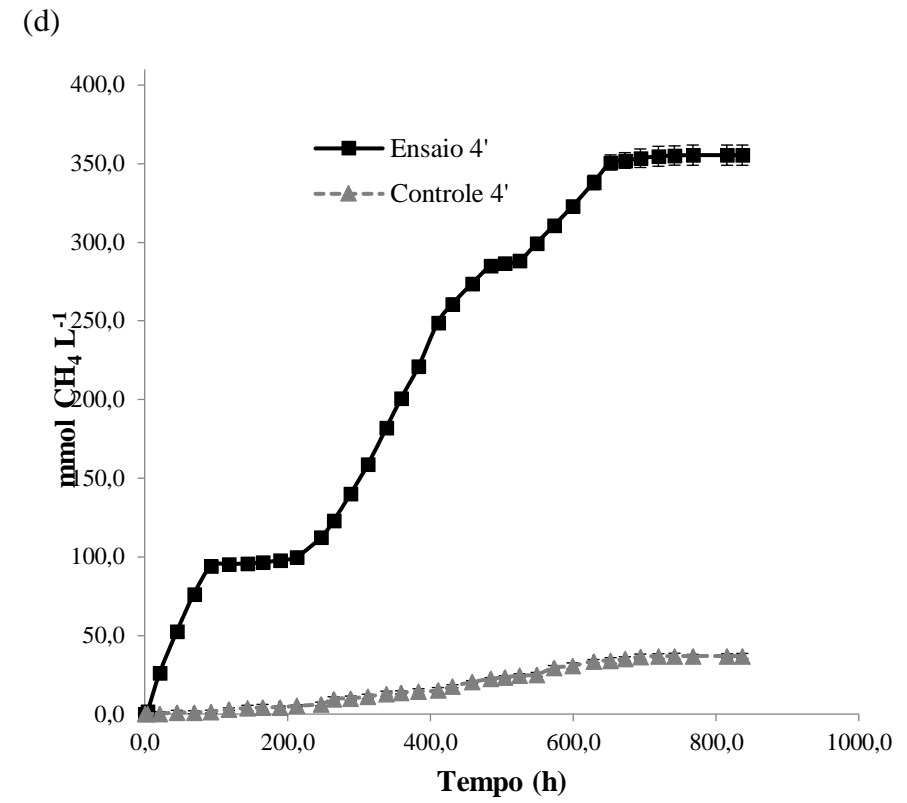
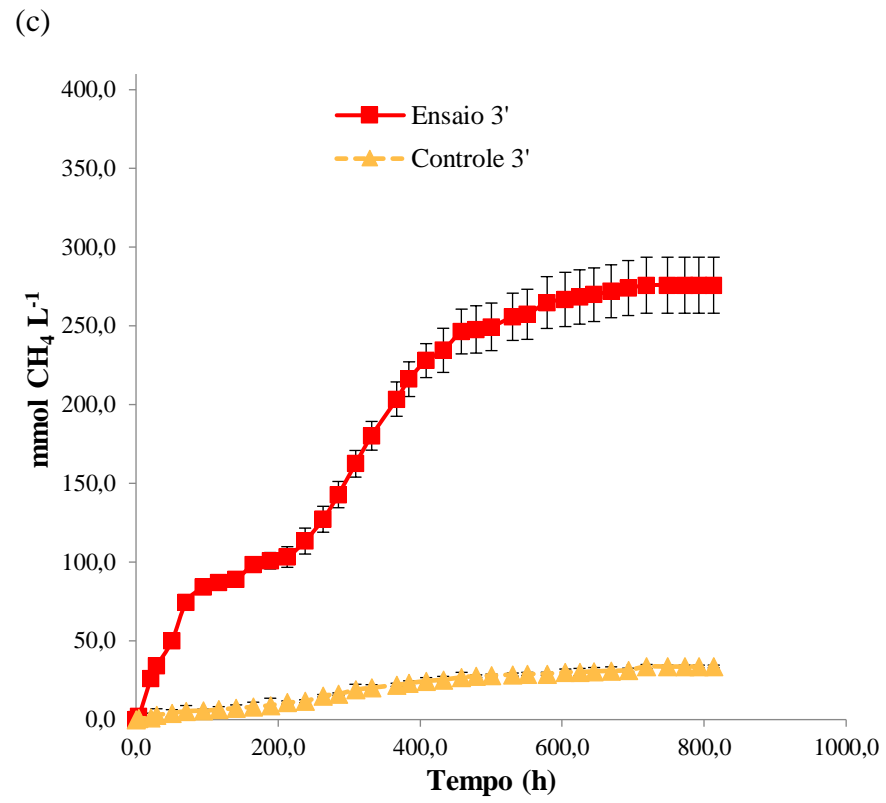
As gerações de CH₄ foram elevadas para todos os ensaios quando comparados com os respectivos controles (Tabela 5.3) (Figura 5.10). Vale ressaltar que os processos de codigestão novamente melhoraram as gerações de biogás. De acordo com SILVA et al., (2018), os processos anaeróbios em dois estágios são identificados como processos promissores, tendo em vista a redução da carga de matéria orgânica além de aumentarem a eficiência geral de conversão de energia pela geração de CH₄ em elevadas concentrações.

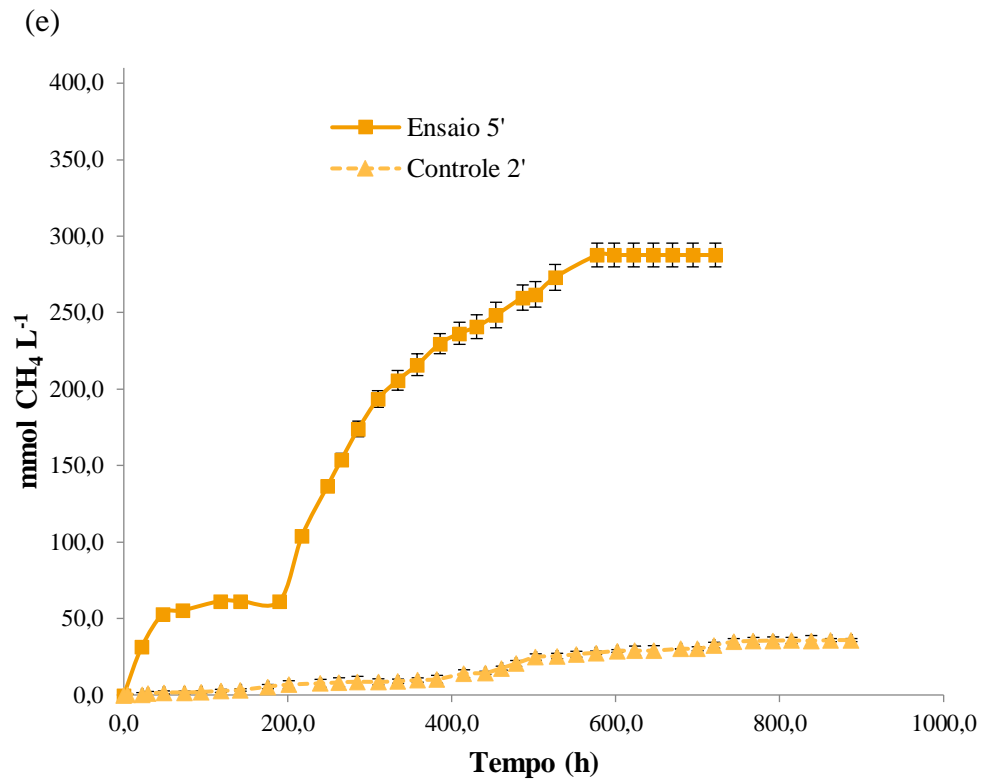
Tabela 5.4 – Relações sintróficas entre bactérias e arqueias metanogênicas identificadas para o inóculo II *in natura*.

Bactérias	Consome	Produz	Utilizado por
<i>Aminobacterium</i>	Aminoácidos (extrato de carne, extrato de levedura e peptona de carne)	Ácidos graxos e amônia	<i>Methanobacterium</i> (hidrogenotrófica) – sequestrante de hidrogênio
<i>Proteiniphilum</i>	Substratos orgânicos (glicerol e glicose)	Acetato	<i>Methanosaeta</i> e <i>Methanosarcina</i>
<i>Syntrophomonas</i> e <i>Gelria</i>	Ácidos graxos presentes no glicerol bruto (MONG)	Acetato	<i>Methanosaeta</i> e <i>Methanosarcina</i>
<i>Fastidiosipila</i> e <i>Proteiniclasticum</i>	Proteínas	Acetato	<i>Methanosaeta</i> e <i>Methanosarcina</i>
<i>Candidatus_Cloacamonas</i>	Substratos orgânicos complexos	H ₂	Metanogênicas hidrogenotróficas (<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanoculleus</i> e <i>Methanoregula</i>)
<i>Macellibacteroides</i>	Monossacarídeos e dissacarídeos	Acetato	<i>Methanosaeta</i> e <i>Methanosarcina</i>
<i>Petrimonas</i>	Carboidratos	Acetato e H ₂	Metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas
<i>Lutispora</i>	Lignocelulose	Acetato	Metanogênicas acetoclásticas

Figura 5.10 - Geração de CH_4 (mmol L^{-1}) para os Ensaio e Controles: 1' (a), 2' (b), 3' (c), 4' (d) e 5' (e), operados em batelada com o inóculo II *in natura* a 37°C .







Ensaio 1': Efluente do Ensaio 1; Controle 1': Efluente do Controle 1; Ensaio 2': Efluente do Ensaio 2; Controle 2': Efluente do Controle 2; Ensaio 3': Efluente do Ensaio 3; Controle 3': Efluente do Controle 3; Ensaio 4': Efluente do Ensaio 4; Controle 4': Efluente do Controle 4 e Ensaio 5': Efluente do Ensaio 5.

NATHAO, (2012) reportou que a digestão anaeróbia usando somente o glicerol como única fonte de carbono proporcionou baixa geração acumulada de CH₄ de 72,90 mL (11,46 mmol CH₄ L⁻¹) quando comparado com o ensaio de codigestão envolvendo glicerol e casca de banana, ocasionando um aumento significativo da geração de biogás para 467,10 mL (73,44 mmol CH₄ L⁻¹).

SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, (2019) analisaram a geração de biogás envolvendo a codigestão do glicerol bruto em glicose comparada com um controle contendo somente glicerol. Os experimentos realizados em batelada mostraram que o controle gerou apenas 63,79 mL de CH₄ (10,03 mmol CH₄ L⁻¹) enquanto a codigestão proporcionou uma elevada geração de CH₄ de 298,20 mL (46,90 mmol CH₄ L⁻¹). De acordo com os autores, a glicose impulsionou a geração de gás metano na cofermentação de glicerol/glicose, servindo como substrato doador de hidrogênio para fornecer tanto equivalentes redutores como ATP para a célula microbiana, como é diretamente induzido na glicólise como glicose 6-fosfato e, finalmente, convertido em CH₄.

Como relatado nos trabalhos mencionados anteriormente, o presente estudo também trouxe um comparativo entre os ensaios de codigestão e os controles contendo somente glicerol (Figura 5.10). Os ensaios no 2º estágio, provenientes dos efluentes da codigestão do 1º estágio, geraram maiores concentrações de CH₄ quando comparados aos referidos controles. Assim, a glicose remanescente do 1º estágio foi utilizada pelos microrganismos no 2º estágio, melhorando as taxas de geração do biogás. Além disso, este estudo destacou-se pelas elevadas gerações de CH₄ quando comparadas aos trabalhos da literatura, indicando a potencialidade dos processos envolvendo estágios sequenciais para a codigestão do glicerol bruto com vinhaça citrícola na geração de biogás.

5.4.3 Biosistemas Fermentativos (1º Estágio) operados com o inóculo II.

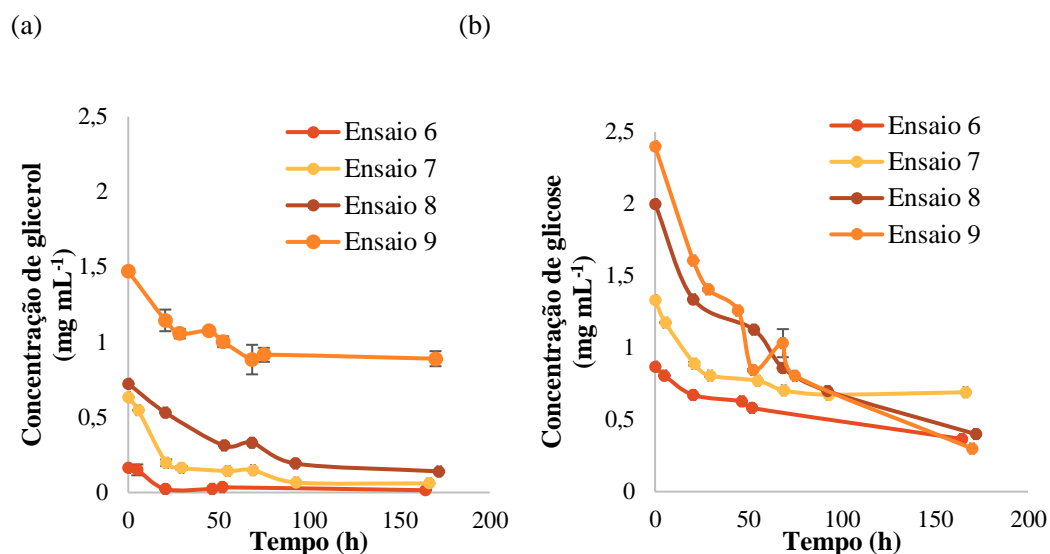
Para os ensaios envolvendo o inóculo II, a manutenção da DQO também foi observada (Tabela 5.5), semelhantemente ao relatado para o inóculo I. As taxas de remoção de glicerol foram diminuindo com o aumento da matéria orgânica. Elevadas concentrações de glicerol foram removidas nos ensaios 6 (90,74 % de glicerol removido), 7 (90,50 %) e 8 (80,60 %) (Tabela 5.5, Figura 5.11).

Tabela 5.5 - Resultado da operação no 1º estágio (fermentação) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo II a 37 °C.

Parâmetros	Condições							
	Controle 6	Ensaio 6	Controle 7	Ensaio 7	Controle 8	Ensaio 8	Controle 9	Ensaio 9
Tempo de operação dos reatores (h)	164,50	164,50	166,50	166,50	172,00	172,00	75,00	75,00
Remoção de glicerol (%)	93,81	90,74	69,59	90,50	71,96	80,60	30,83	39,90
Remoção de glicose (%)	-	48,08	-	57,85	-	84,17	-	88,00
DQO Inicial (g L ⁻¹)	18,08	19,48	20,54	22,02	18,66	36,68	31,57	41,10
DQO Final (g L ⁻¹)	14,81	17,67	20,95	21,97	19,23	34,01	30,38	39,07
pH Inicial	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
pH Final	5,17	5,40	5,10	5,00	5,20	4,90	5,30	5,19
Geração etanol (mg L ⁻¹)	-	18,50	-	-	-	-	-	-
Geração ácido acético (mg L ⁻¹)	125,00	256,00	244,50	490,00	159,00	991,00	176,00	405,00
Geração ácido butírico (mg L ⁻¹)	8,00	21,70	8,30	8,51	9,70	11,50	8,30	8,40
Geração ácido propiônico (mg L ⁻¹)	192,00	200,10	238,00	203,00	195,00	214,70	213,00	207,00
Geração ácido láctico (mg L ⁻¹)	430,00	1517,00	684,60	2313,00	630,00	3680,00	500,00	4768,00

Ensaio 6: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBR + 5 g DQO L⁻¹ VC); Controle 6: 5 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 7: 20 g DQO L⁻¹ (10 g DQO L⁻¹ GBR + 10 g DQO L⁻¹ VC); Controle 7: 10 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 8: 30 g DQO L⁻¹ (15 g DQO L⁻¹ GBR + 15 g DQO L⁻¹ VC); Controle 8: 15 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 9: 40 g DQO L⁻¹ (20 g DQO L⁻¹ GBR + 20 g DQO L⁻¹ VC); Controle 9: 20 g DQO L⁻¹ GBR. GBR: glicerol bruto do tratamento de óleos residuais domésticos e VC: vinhaça citrícola.

Figura 5.11 - Variação temporal das remoções de glicerol (a) e glicose (b) para a codigestão do GBR com VC nos ensaios em batelada operados com o inóculo II a 37 °C.



Ensaio 6: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBR + 5 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 7: 20 g DQO L⁻¹ (10 g DQO L⁻¹ GBR + 10 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 8: 30 g DQO L⁻¹ (15 g DQO L⁻¹ GBR + 15 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 9: 40 g DQO L⁻¹ (20 g DQO L⁻¹ GBR + 20 g DQO L⁻¹ VC). GBR: glicerol bruto do tratamento de óleos residuais domésticos e VC: vinhaça citrícola.

Já para os controles 7, 8 e 9, taxas reduzidas de glicerol removido foram registradas (69,59 %, 71,96 % e 30, 83 %, respectivamente), evidenciando que os processos de codigestão foram eficientes, facilitando a remoção deste resíduo. Para o ensaio 9, apenas 39,90 % de glicerol foi removido, indicando que taxas elevadas de resíduos (GBR e VC) foram tóxicos para o inóculo II, onde, juntamente com elevadas concentrações de GBR nos ensaios, aumentaram-se assim as concentrações das impurezas presentes nesse resíduo, onde apenas uma pequena concentração pudesse ser metabolizada pelos microrganismos.

Como o inóculo II foi reativado em meio PYG contendo glicerina, os microrganismos estavam mais adaptados ao glicerol em um primeiro momento do que com glicose, como pode ser verificado pela elevada taxa de remoção de glicerol (90,74 %) no ensaio 6 quando comparada à glicose (48,08 %). Conforme as concentrações dos resíduos nos ensaios foram aumentadas, observou-se que os microrganismos passaram a preferir glicose ao invés de glicerol, tendo em vista que os consumos de glicose passaram a ser superiores. De acordo com SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, (2019a), a remoção de glicerol em elevadas concentrações passa a ser menos favorecido na presença de glicose, como visto no presente estudo. Além disso, segundo os autores, a glicose é o substrato mais favorável para a maioria dos microrganismos, por afinidade elevada ao sistema da fosfotransferase gerando muita energia (SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019b).

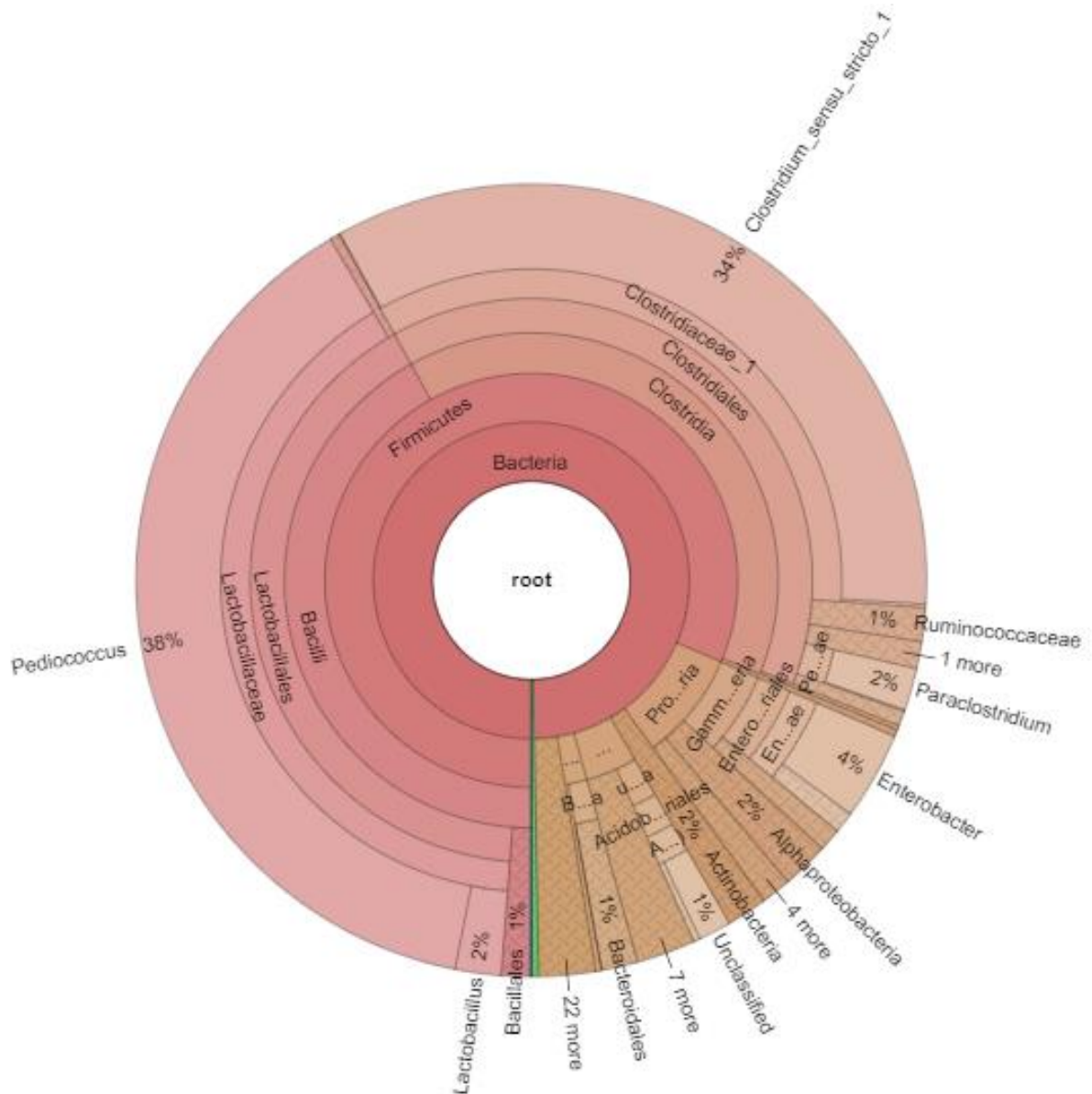
A diminuição mais acentuada do pH nos ensaios 7 e 8 (5,00 e 4,90, respectivamente) foi proporcional às elevadas gerações de ácido acético, 490,00 mg L⁻¹ e 991,00 mg L⁻¹, respectivamente.

Diferentemente do que foi observado nos ensaios envolvendo o inóculo I, não houve geração de H₂ e 1,3-PD nestes ensaios com o inóculo II, sendo produzidos ácido lático para todos os ensaios e referidos controles. Conforme apresentado na Figura 5.12, a espécie *Pediococcus acidilactici* estava presente no inóculo II em abundância relativa de 38,41 %, quando comparado à espécie *Clostridium beijerinckii*, com 33,91 %. Segundo PASTERIS; DE SAAD, (2008) *Pediococcus* pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas e por isso, foi caracterizada a elevada produção de ácido lático para todos os ensaios e referidos controles (Tabela 5.4). O inóculo II, em ensaios de codigestão contendo os dois resíduos, GBR e VC, selecionou a família *Lactobacillaceae* (a qual contém o gênero *Pediococcus*), predominando sobre os microrganismos *Clostridium*.

Segundo GOMES et al., (2015) *Clostridium* sp. e *Enterobacter* sp. são os principais produtores de H₂ em consórcios fermentativos. Logo, a ausência de H₂ nos ensaios do presente estudo se deveu à presença de bactérias não formadoras de endósporos, como as bactérias ácido lácticas, que inibem a geração de H₂ devido à competição pelos carboidratos, prevalecendo sobre os microrganismos produtores de H₂.

LIU et al., (2009) sugeriu o efeito inibitório na geração de H₂ devido à presença de *Lactobacillus* sp. que possuem a capacidade de secretar bacteriocinas que apresentam efeito deletério sobre outras bactérias. As bacteriocinas apresentam uma grande vantagem na competição com outras bactérias pelos mesmos nutrientes, limitando o estabelecimento de outras espécies (KNOLL; DIVOL; DU TOIT, 2008). Segundo TODOROV; DICKS, (2009), microrganismos pertencentes à espécie *Pediococcus acidilactici* são reconhecidos como produtores de bacteriocinas, além dos microrganismos *Lactobacillus*. Dessa forma, *Pediococcus acidilactici* foi encontrada no presente estudo com elevada abundância relativa (38,41 %) (Figura 5.12), o que teria, dessa forma, inibido a atividade metabólica do *Clostridium beijerinckii* (33,91 % de abundância relativa) suprimindo a geração de H₂, elevando a produção de ácido lático.

Figura 5.12 - Visão geral da classificação biomolecular para a amostra 3 (inoculo II pré-tratado ao final do ensaio 9).



Além disso, a ausência de 1,3-PD se deveu à rota metabólica dos microrganismos frente aos substratos. Conforme verificado na seção 5.5.1, a produção de 1,3-PD depende principalmente do fluxo de moléculas de NADH. Porém, durante a codigestão da VC (contendo açúcares) com GBR, o fluxo de NADH gerado durante a fermentação da VC regenerou o NADH para NAD⁺ através da produção de ácido lático na rota oxidativa, ocasionando uma competição na rota redutiva de produção de 1,3-PD (VIVEK et al., 2017) (Figura 5.7).

5.4.4 Biosistemas Metanogênicos (2º Estágio) operados com o inóculo II.

Assim como foi observado para os biossistemas metanogênicos na seção 5.4.2., nos ensaios do 2º estágio envolvendo o inóculo II também foram verificadas remoções elevadas dos substratos, mostrando a eficiência dos processos sequenciais de dois estágios como uma solução de pós-tratamento para os biossistemas fermentativos (Tabela 5.6).

Para os ensaios 6' e 7' houve a remoção total de ácido acético e para o ensaio 8', 61 % foi removido. A utilização do acetato está diretamente atrelada à geração de CH₄, tendo em vista que no presente estudo, microrganismos como *Methanosaeta* e *Methanosarcina* possivelmente foram responsáveis pela degradação deste composto proveniente dos sistemas fermentativos, convertendo-os à CH₄ (Figura 5.9). Foi possível detectar, portanto, as maiores gerações de CH₄ para esses referidos ensaios (Tabela 5.6) (Figura 5.13). Além disso, conforme visto na seção 5.4.2., os microrganismos identificados no inóculo II *in natura* (amostra 1) foram responsáveis pelas interações sintróficas com as arqueias metanogênicas, elevando a geração de CH₄ para os referidos ensaios (Tabela 5.6).

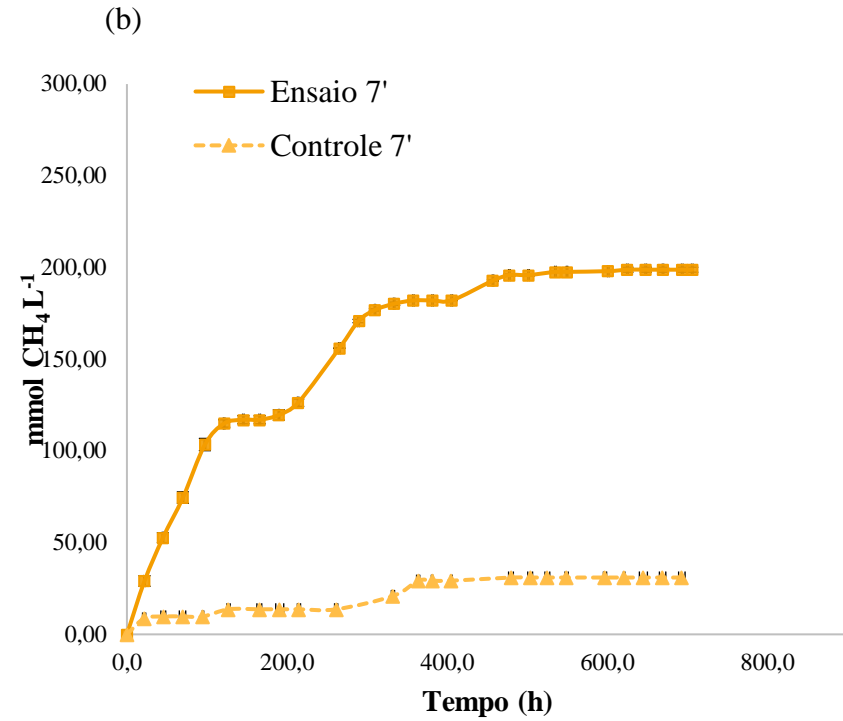
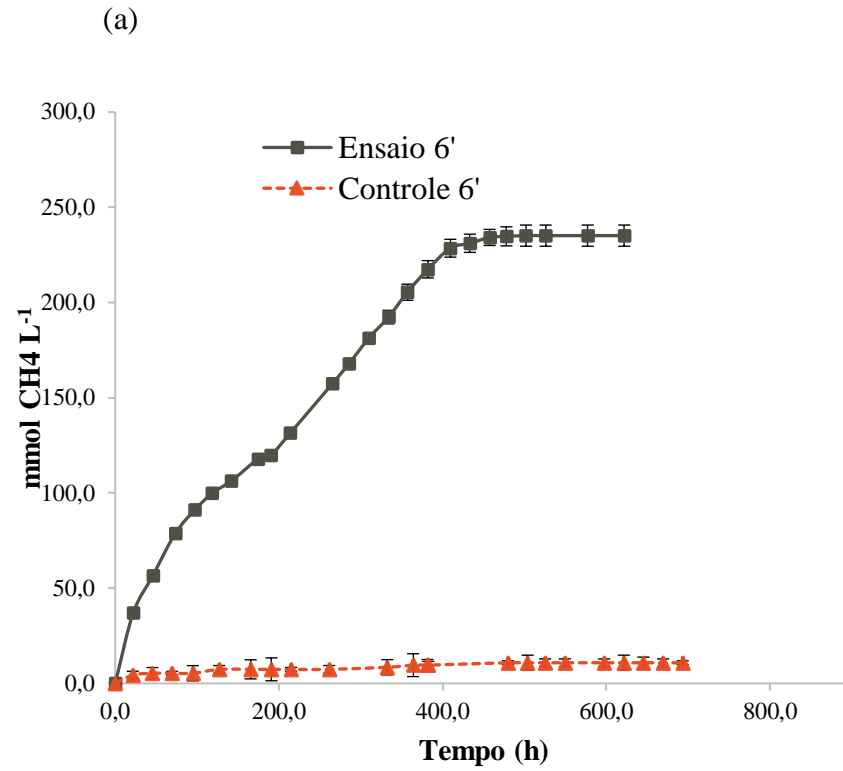
Porém, para o ensaio 9' foram registradas as concentrações de CH₄ mais reduzidas (Figura 5.13 d) bem como de DQO removida. Além disso, verificou-se que a concentração de ácido acético aumentou ao final do ensaio (726,80 mg L⁻¹) quando comparada à inicial (405,00 mg L⁻¹) (Tabela 5.6). Os microrganismos presentes no inóculo II *in natura* nos ensaios metanogênicos correspondiam a um consórcio de arqueias metanogênicas e bactérias fermentativas. O aumento da produção deste metabólito pode ser atribuído à atividade das bactérias acidogênicas, sendo que na condição do ensaio 9', foi prevalecida essa comunidade de microrganismos, havendo remoção reduzida da matéria orgânica com geração reduzida de gás metano. Além disso, para este mesmo ensaio, foi verificada uma concentração elevada de ácido propiônico ao final da operação do reator (4893,00 mg L⁻¹). Assim, a queda da geração de CH₄ também poderia ter ocorrido devido a este produto metabólico formado, que num dado instante se acumulou no ensaio metanogênico.

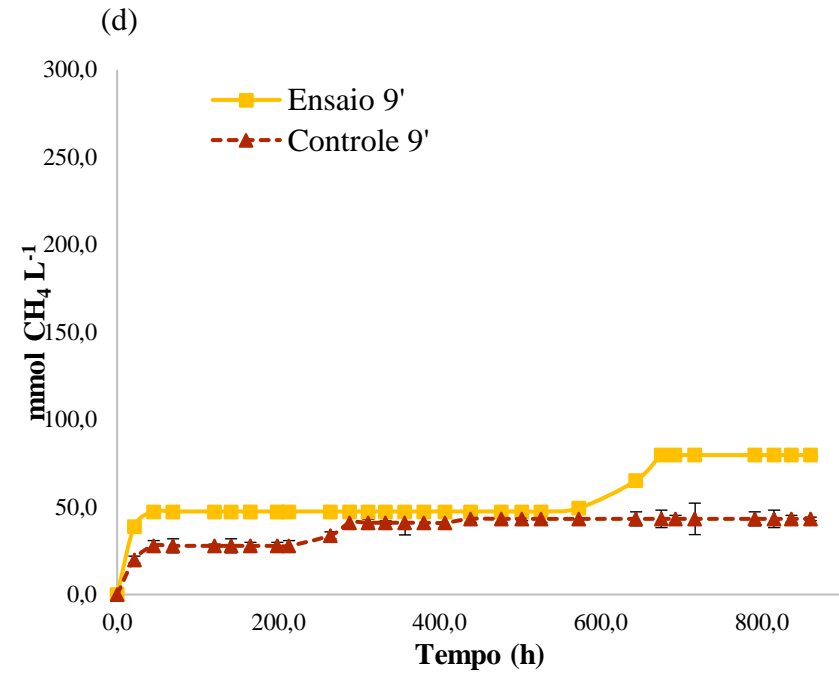
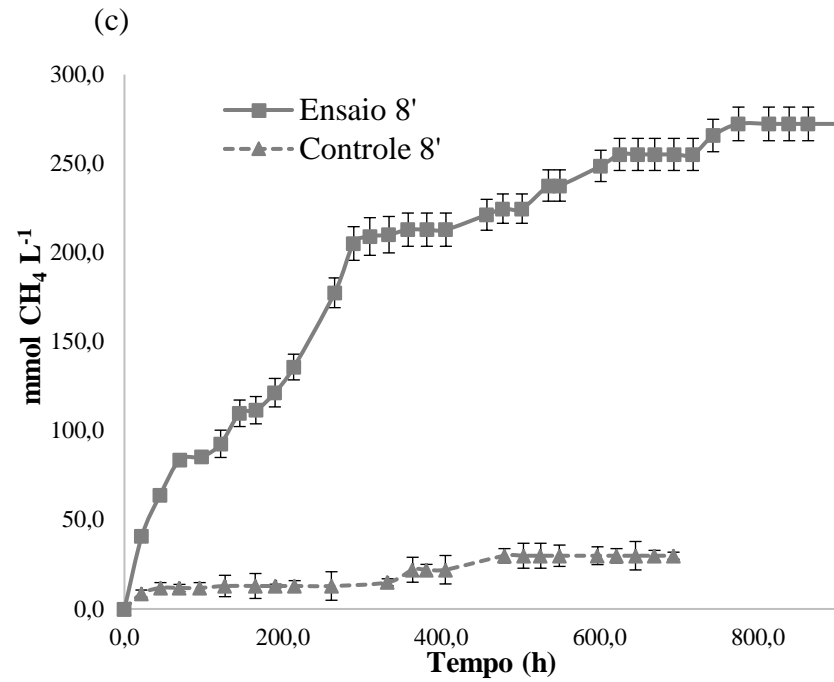
Tabela 5.6 - Resultado da operação no 2º estágio (metanogênese) para os efluentes da codigestão do GBR com VC nos ensaios operados em batelada com o inóculo II a 37 °C.

Parâmetros	Condições							
	Controle 6'	Ensaio 6'	Controle 7'	Ensaio 7'	Controle 8'	Ensaio 8'	Controle 9'	Ensaio 9'
Tempo de operação dos reatores (h)	693,50	622,00	693,50	706,50	693,50	910,00	861,50	861,50
Remoção de glicerol remanescente (%)	86,54	82,73	97,82	92,84	98,61	97,05	99,59	99,65
Remoção de glicose remanescente (%)	-	88,82	-	90,52	-	90,16	-	81,80
Remoção de DQO (%)	86,12	93,46	80,24	85,41	89,66	89,95	56,42	59,84
Ácido acético inicial (mg L⁻¹)	125,00	256,00	244,50	490,00	159,00	991,00	176,00	405,00
Ácido acético final (mg L⁻¹)	120,00	0,00	324,00	0,00	290,00	387,00	257,00	726,80
Ácido propiônico inicial (mg L⁻¹)	192,00	200,10	238,00	203,00	195,00	214,70	213,00	207,00
Ácido propiônico final (mg L⁻¹)	254,00	40,00	424,00	43,00	0,00	0,00	4827,00	4893,00
pH Inicial	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
pH Final	7,85	8,07	7,88	8,07	7,98	8,11	7,57	7,71
Remoção de metanol (%)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Geração máxima de CH₄ (mmol CH₄ L⁻¹)	11,09	259,39	34,88	199,52	41,60	268,82	43,25	79,74

Ensaio 6': Efluente do Ensaio 6; Controle 6': Efluente do Controle 6; Ensaio 7': Efluente do Ensaio 7; Controle 7': Efluente do Controle 7; Ensaio 8': Efluente do Ensaio 8; Controle 8': Efluente do Controle 8; Ensaio 9': Efluente do Ensaio 9; Controle 9': Efluente do Controle 9.

Figura 5.13 - Geração de CH_4 (mmol L^{-1}) para os Ensaio e Controles: 6' (a), 7' (b), 8' (c) e 9' (d), operados em batelada com o inóculo II *in natura* a 37 °C.





Ensaio 6': Efluente do Ensaio 6; Controle 6': Efluente do Controle 6; Ensaio 7': Efluente do Ensaio 7; Controle 7': Efluente do Controle 7; Ensaio 8': Efluente do Ensaio 8; Controle 8': Efluente do Controle 8; Ensaio 9': Efluente do Ensaio 9; Controle 9': Efluente do Controle 9.

NARTKER et al., (2014) estudaram o efeito de concentrações crescentes de glicerol bruto na presença de um lodo granular mesofílico a fim de se elevar o teor de CH₄. O glicerol foi adicionado ao reator em proporções que variaram de 0 a 60 % da taxa de carga orgânica total. Para essas condições, o funcionamento do reator permaneceu equilibrado e estável, sendo que a inibição só foi observada quando a carga de glicerol foi aumentada para 70 %. Isso sugere que cargas elevadas de glicerol podem ser tratadas, desde que sua suplementação seja gradual a fim de permitir a adaptação da comunidade microbiana. Efeito semelhante foi observado no presente estudo, onde uma concentração elevada de DQO juntamente com o glicerol residual do processo fermentativo poderiam ter sido os responsáveis pela inibição da comunidade microbiana, que não tiveram tempo hábil para se adaptar àquela condição, resultando em baixas concentrações de CH₄ geradas tanto para o ensaio 9' quanto para seu respectivo controle (Figura 5.14 d).

SILVA et al., (2018) observaram fato similar ao presente estudo, no qual foi estudada a geração de CH₄ a partir de efluentes fermentativos para concentrações elevadas de glicerol bruto. Os autores identificaram que, após 15 dias de operação do reator metanogênico, houve uma queda do pH para 6,6, devido à presença de ácido propiônico, que se acumulou no ensaio, onde esse excesso não conseguiu ser metabolizado pelos microrganismos presentes no consórcio, afetando diretamente na produção de CH₄. De acordo com SUNYOTO et al., (2016), o ácido propiônico possui degradação lenta. Além disso, a energia necessária para oxidar anaerobiamente o ácido propiônico em acetato (+ 76,1 kJ mol⁻¹) é quase o dobro da necessária para a formação de butirato (+ 48,1 kJ mol⁻¹). Dessa forma, a taxa de formação de acetato a partir do ácido propiônico torna-se reduzida, influenciando diretamente numa menor geração de CH₄, conforme observado no presente estudo.

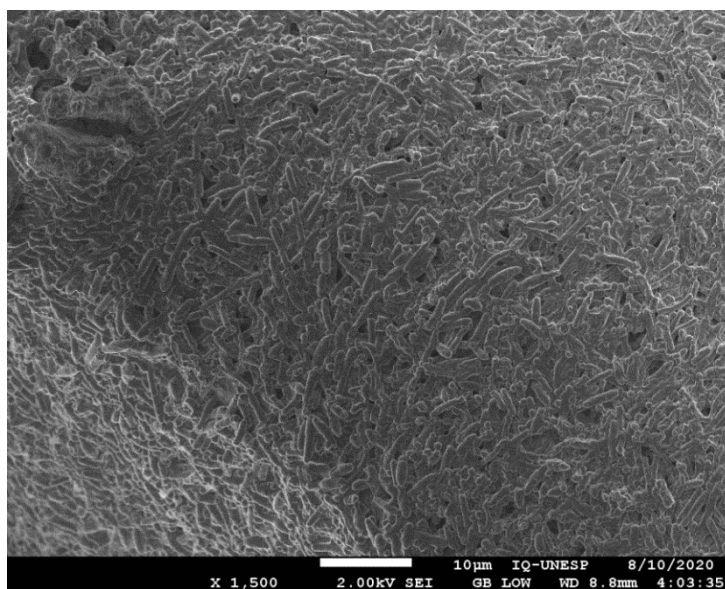
Assim como observado na seção 5.4.2., o pH ao final da operação dos reatores aumentou quando comparado ao início dos ensaios, sugerindo que com a remoção da DQO, os ácidos graxos voláteis foram desse modo utilizados pelos microrganismos metanogênicos, ocorrendo o aumento do pH.

5.4.5 Análises da codigestão para cenários distintos em ensaios operados com o inóculo I.

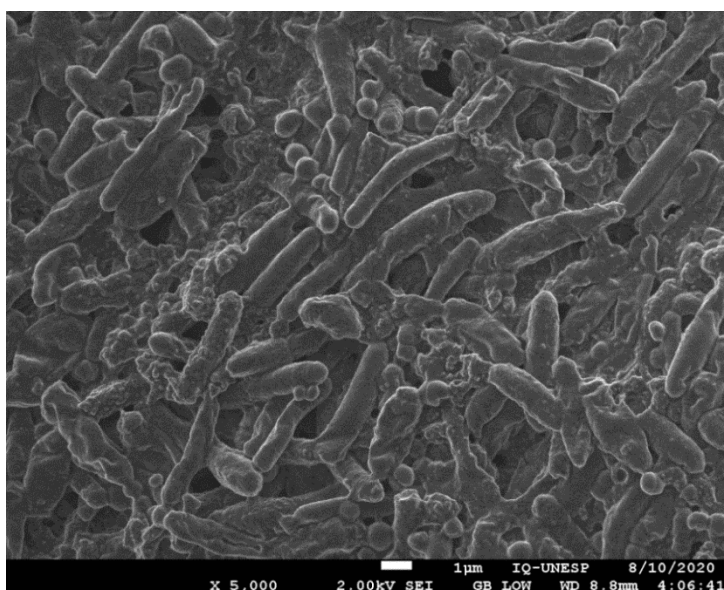
A fim de serem investigadas as gerações de H_2 sob diferentes substratos em concentrações de resíduos mais reduzidas, os ensaios 10, 11 e 12 foram operados com o inóculo I, já que, de acordo com os resultados anteriores, este foi o responsável pela geração de H_2 nos experimentos no primeiro estágio (Tabela 5.2). Além disso, as análises de MEV do inóculo I revelaram o predomínio de bacilos, sendo tipicamente caracterizado por microrganismos produtores de H_2 como o *Clostridium* (WANG et al., 2020c) e *Bacillus* (LERTSRIWONG; GLINWONG, 2020) (Figura 5.14 a e b).

Figura 5.14 - MEV do inóculo I com o predomínio de bacilos: (a) ampliado 1500 X (a) e (b) 5000 X.

(a)



(b)



5.4.6 Biosistemas Fermentativos – Ensaio 10,11 e 12.

Os resultados dos ensaios 10, 11 e 12 estão apresentados na Tabela 5.7 para os sistemas fermentativos.

As remoções de glicerol bruto para os ensaios 10, 11 e 12 foram elevadas (98,02 %, 99,80 % e 98,91 %, respectivamente) devido às condições otimizadas na qual os ensaios foram conduzidos (Figura 5.15 a e b).

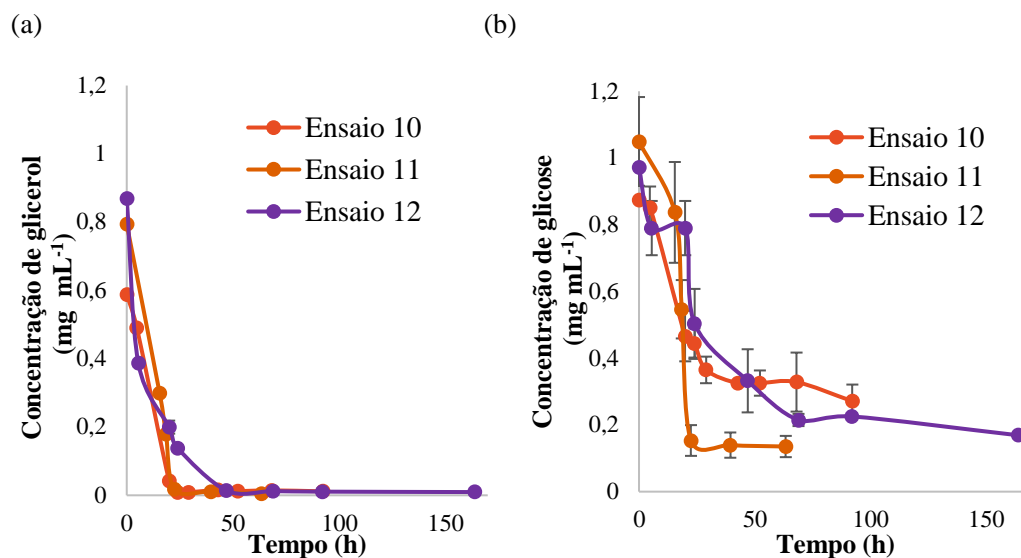
O ensaio 10 foi operado na presença do glicerol bruto proveniente de óleos residuais domésticos, sendo pré-tratado (GBRT), cujo favorecimento da remoção deste substrato se deveu à eliminação de sabão. O pré-tratamento do glicerol bruto com a adição de HCl foi responsável por converter os sabões solúveis a ácidos graxos insolúveis, onde as diferentes fases formadas (fase superior: ácidos graxos livres e fase inferior: glicerol bruto pré-tratado) puderam ser separadas, sendo recuperada a fase de glicerol bruto livre de sabões (CHI et al., (2007). A presença de sabão é considerada um interferente na atividade microbológica (RODRIGUES et al., 2016), o que ocasionou a diferença de remoção de glicerol no ensaio 1 (93,19 %) no qual foi operado sob condições próximas ao ensaio 10 (98,02 %), diferenciando-se apenas na presença do glicerol bruto sem pré-tratamento (GBR), ficando evidente a melhoria de remoção deste substrato quando na ausência de sabão.

Tabela 5.7 - Resultados da operação no 1º estágio (fermentação) para a codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto com VC em ensaios operados em batelada com o inóculo I, a 37 °C.

Parâmetros	Ensaio					
	Controle 10	Ensaio 10	Controle 11	Ensaio 11	Controle 12	Ensaio 12
Tempo de operação dos reatores (h)	92,30	92,30	63,50	63,50	164,00	164,00
Remoção de glicerol (%)	97,39	98,02	97,03	99,80	98,95	98,91
Remoção de glicose (%)	-	77,20	-	87,12	-	82,60
DQO Inicial (g L ⁻¹)	17,03	19,66	17,93	19,19	6,60	10,10
DQO Final (g L ⁻¹)	16,52	18,86	17,74	19,03	6,50	9,98
pH Inicial	5,50	5,50	5,52	5,52	5,52	5,52
pH Final	4,77	5,24	6,40	5,19	6,50	5,95
Geração ácido acético (mg L ⁻¹)	253,00	650,00	28,20	248,00	422,00	586,00
Geração ácido butírico (mg L ⁻¹)	-	559,00	415,00	743,00	200,00	253,00
Geração ácido propiônico (mg L ⁻¹)	200,00	2562,00	147,00	2730,00	587,00	919,00
Geração ácido láctico (mg L ⁻¹)	392,00	457,00	965,00	1846,00	-	-
Geração máxima de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	3,44	15,77	1,57	7,32	4,52	4,47
Rm (mmol L ⁻¹ cultura. h)	0,70	0,64	0,64	1,93	0,11	0,08
L (h)	4,56	3,20	1,31	13,38	6,03	-1,25

Ensaio 11: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBRT + 5 g DQO L⁻¹ VC); Controle 11: 5 g DQO L⁻¹ GBRT; Ensaio 12: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBR + 5 g DQO L⁻¹ VC + esgoto sanitário); Controle 12: 5 g DQO L⁻¹ GBR; Ensaio 13: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBV + 5 g DQO L⁻¹ VC) e Controle 13: 5 g DQO L⁻¹ GBV. GBRT: glicerol bruto de óleos residuais domésticos pré-tratado; VC: vinhaça citrícola; GBR: glicerol bruto de óleos residuais domésticos e GBV: glicerol bruto de óleos animais e vegetais.

Figura 5.15 - Variação temporal das remoções de glicerol (a) e glicose (b) para a codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto com VC nos ensaios 10, 11 e 12 em batelada operados com o inóculo I a 37 °C.



Ensaio 11: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBRT + 5 g DQO L⁻¹ VC); Ensaio 12: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBR + 5 g DQO L⁻¹ VC + esgoto sanitário) e Ensaio 13: 10 g DQO L⁻¹ (5 g DQO L⁻¹ GBV + 5 g DQO L⁻¹ VC). GBRT: glicerol bruto de óleos residuais domésticos pré-tratado; VC: vinhaça citrícola; GBR: glicerol bruto de óleos residuais domésticos e GBV: glicerol bruto de óleos animais e vegetais.

Quanto ao ensaio 11, o glicerol bruto advindo de óleos vegetais e animais (GBV) foi caracterizado pela presença reduzida de contaminantes, como sabão (8,01 %) e metanol (5,33 %), quando comparado ao GBR (23,38 % de sabão, 15,84 % de metanol), o que refletiu na remoção elevada deste substrato em 99,80 % (Tabela 5.7).

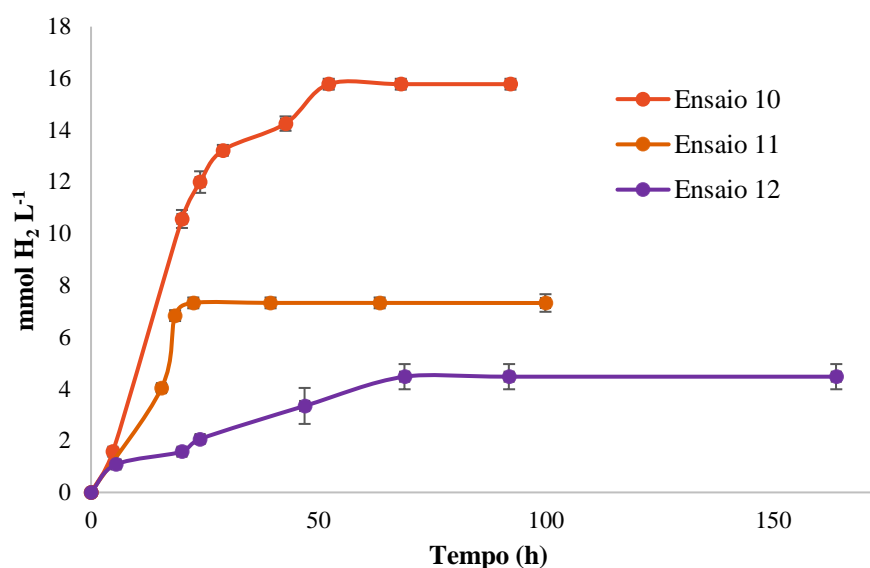
A remoção elevada de glicerol também foi observada para o ensaio 12, onde a presença de esgoto sanitário facilitou a remoção do GBR. O esgoto sanitário diluiu o GBR, já que ele é composto de 99,9 % de água, diminuindo a sobrecarga orgânica, diluindo os compostos tóxicos encontrados neste substrato como o metanol e sabão, proporcionando efeitos sinérgicos e complementares no qual pôde ter fornecido concentrações balanceadas de alguns nutrientes como o nitrogênio (4,02 g L⁻¹) que compensaram a falta de nutrientes e contribuíram para a elevada remoção do GBR (RODRIGUES et al., 2020a).

A remoção de glicose foi elevada para os ensaios 10, 11 e 12 (77,20 %, 87,12 % e 82,60 %, respectivamente) (Tabela 5.7) quando comparado ao ensaio 1 (74,00 %), por exemplo, que foi operado nas mesmas concentrações de substratos. Cabe ressaltar que as condições otimizadas nos ensaios 10, 11 e 12 que envolveram gliceróis brutos com concentrações de impurezas reduzidas bem como a presença do esgoto sanitário no ensaio 12, proporcionaram

uma facilitação na degradação microbiológica para ambos os substratos na codigestão, contribuindo para a otimização de consumo no processo como um todo.

O pré-tratamento do GBR refletiu diretamente na maior geração de H_2 no ensaio 10 (15,77 $mmol H_2 L^{-1}$) (Tabela 5.7 e Figura 5.16) quando comparado ao ensaio 1 (glicerol bruto sem o pré-tratamento) (4,52 $mmol H_2 L^{-1}$) (Figura 5.6). Isso evidenciou o efeito retardante da presença de sabão no glicerol bruto para a atividade microbiológica na geração de H_2 assim como relatado por CHI et al., (2007), RODRIGUES et al., (2020b), RODRIGUES et al., (2019b) e SARMA et al., (2012). Além disso, a expressiva geração de H_2 no ensaio 10 em relação ao seu controle (3,44 $mmol H_2 L^{-1}$) confirma o efeito sinérgico que a codigestão anaeróbia proporcionou tanto em termos de contribuição na geração de H_2 quanto na remoção dos substratos. A presença de glicose e macro e micronutrientes da VC além de diluir os componentes tóxicos presentes no glicerol bruto, facilitaram o seu consumo (ASTALS; NOLLA-ARDÈVOL; MATA-ALVAREZ, 2013; KURAHASHI et al., 2017).

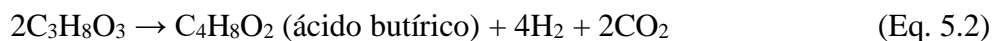
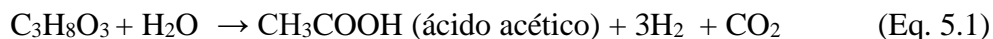
Figura 5.16 - Geração de H_2 ($mmol L^{-1}$) nos ensaios 10, 11 e 12 operados com o inóculo I.



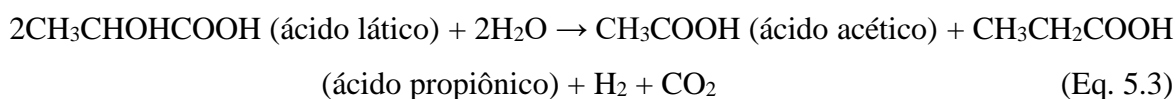
Ensaio 10: 10 g DQO L^{-1} (5 g DQO L^{-1} GBRT + 5 g DQO L^{-1} VC); Ensaio 11: 10 g DQO L^{-1} (5 g DQO L^{-1} GBR + 5 g DQO L^{-1} VC + esgoto sanitário) e Ensaio 12: 10 g DQO L^{-1} (5 g DQO L^{-1} GBV + 5 g DQO L^{-1} VC). GBRT: glicerol bruto de óleos residuais domésticos pré-tratado; VC: vinhaça citrícola; GBR: glicerol bruto de óleos residuais domésticos e GBV: glicerol bruto de óleos animais e vegetais.

A geração de H_2 é diretamente proporcional à geração dos ácidos orgânicos voláteis presentes no meio líquido. Na rota oxidativa de bioconversão do glicerol, as elevadas concentrações dos ácidos acético e butírico estão acompanhadas às maiores gerações de H_2 (RODRIGUES et al., 2016) (Equações 5.1 e 5.2). Portanto, no ensaio 10 onde foi registrada a

maior geração de H₂, verificaram-se concentrações elevadas de ácido acético (650,00 mg L⁻¹) e ácido butírico (559,00 mg L⁻¹) (Tabela 5.7).



Além disso, elevada concentração de ácido propiônico foi observada ao final dos ensaios 10 e 11 (2562,00 mg L⁻¹ e 2730,00 mg L⁻¹, respectivamente). Segundo MEIER et al., (2020), o ácido propiônico é um precursor do ácido lático (Equação 5.3), o que indica sobrecarga no sistema apesar de sua reação gerar H₂.



Alguns estudos reportam que níveis elevados de ácidos propiônico e butírico estão positivamente relacionados à geração de H₂. Ainda segundo o trabalho de MEIER et al., (2020), elevadas concentrações destes metabólitos estavam intimamente relacionadas às adições de glicerol nos reatores fermentativos.

O glicerol possui grau elevado de redução, o que favorece a produção de metabólitos mais reduzidos como o ácido propiônico. Porém, a geração deste composto pode causar desequilíbrio redox no metabolismo, levando à redução do crescimento celular quando o glicerol é usado como única fonte de carbono. Como forma de superar esse problema, alguns estudos utilizaram a proposta da codigestão do glicerol com glicose como um processo eficiente de apoio à formação do produto e ao crescimento celular. Segundo WANG; YANG, (2013), quando glicerol e glicose foram usados como substratos da codigestão, estes foram removidos simultaneamente. Nesse caso, o glicerol foi usado principalmente para a biossíntese do ácido propiônico e a glicose como um substrato doador de hidrogênio para o fornecimento de equivalentes redutores e ATP para a síntese de biomassa celular.

Assim, no presente estudo, a codigestão de ambos os substratos, glicerol e glicose (presente na VC), ocasionou o equilíbrio do sistema conforme relatado por WANG; YANG, (2013), sendo removidos, simultaneamente, ao passo que foi gerada concentração elevada de ácido propiônico nos ensaios 10, 11 e 12. Além disso, a diferença de produção do ácido propiônico dos ensaios com os respectivos controles (200,00, 147,00 e 587,00 mg L⁻¹ para os controles 10', 11' e 12', respectivamente) (Tabela 5.7), demonstraram a produção reduzida

deste metabólito quando o glicerol foi usado como única fonte de carbono, reforçando o equilíbrio redox do metabolismo na codigestão.

Apesar das concentrações elevadas dos ácidos propiônico (2730,00 mg L⁻¹) e butírico (743,00 mg L⁻¹) no ensaio 11, geração reduzida de H₂ (7,32 mmol H₂ L⁻¹) foi verificada, quando comparada ao ensaio 10 (15,77 mmol H₂ L⁻¹), o que pode ser justificado pela elevada concentração de ácido láctico (1846,00 mg L⁻¹) (Tabela 5.7). Assim como descrito nas seções anteriores, os microrganismos produtores de ácido láctico competem com os geradores de H₂, reduzindo a geração deste biogás. A alteração do tipo de glicerol bruto utilizado nos ensaios 10 para o ensaio 11 alterou a composição dos metabólitos obtidos após a operação dos respectivos ensaios.

O ensaio 12 foi uma proposta mais próxima da realidade, onde os substratos (GBR e VC) diluídos em esgoto sanitário, sem a presença de compostos sintéticos para compor o meio de cultivo, capazes de gerar H₂ (4,47 mmol H₂ L⁻¹) (Figura 5.16) tanto quanto no ensaio 1, em meio de cultivo PYG modificado (4,52 mmol H₂ L⁻¹). A ausência do meio sintético na codigestão reduz os custos de operação dos reatores. A codigestão do GBR e VC juntamente com o esgoto sanitário promoveu um efeito sinérgico e complementar, balanceando a proporção de nutrientes, além de diluir os compostos prejudiciais e tóxicos encontrados em excesso em ambos os resíduos, que poderiam inibir a atividade microbiana (KURAHASHI et al., 2017; SILVA et al., 2018).

5.4.7 Biosistemas Metanogênicos – Ensaios 10', 11' e 12'.

Os resultados dos ensaios 10', 11' e 12' estão apresentados na Tabela 5.8 para os sistemas metanogênicos.

Para estes ensaios metanogênicos, elevada remoção de matéria orgânica foi observada por meio da remoção da DQO (Tabela 5.8). Glicerol e glicose remanescentes dos processos fermentativos foram removidos, bem como os metabólitos que foram gerados ao final dos ensaios 10, 11 e 12.

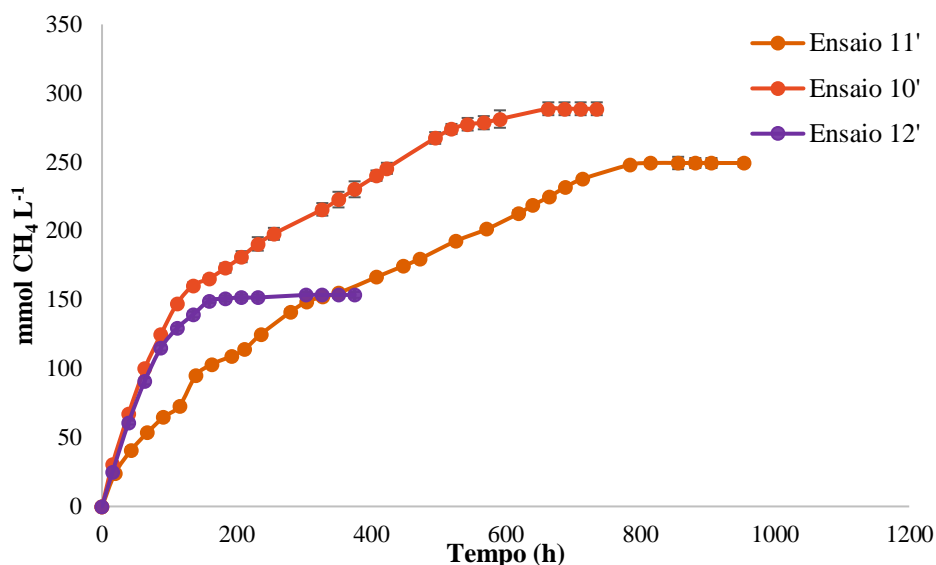
Tabela 5.8 - Resultados da operação no 2º estágio (metanogênese) para os efluentes da codigestão de diferentes tipos de glicerol bruto com VC nos ensaios operados em batelada com o inóculo II a 37 °C.

Parâmetros	Ensaio					
	Controle 10'	Ensaio 10'	Controle 11'	Ensaio 11'	Controle 12'	Ensaio 12'
Tempo de operação dos reatores (h)	735,50	735,50	954,00	954,00	375,00	375,00
Remoção de glicerol remanescente (%)	80,56	78,81	63,25	25,07	76,19	77,85
Remoção de glicose remanescente (%)	-	83,14	-	43,94	-	83,29
Remoção de DQO (%)	81,41	88,53	84,73	90,73	95,11	94,95
pH Inicial	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
pH Final	8,08	8,11	7,64	7,71	7,00	7,06
Remoção de metanol (%)	98,67	100,00	95,87	97,80	89,00	98,80
Geração máxima de CH₄ (mmol CH₄ L⁻¹)	51,65	288,87	59,98	249,37	25,67	153,58

Ensaio 10': Efluente do Ensaio 10; Controle 10': Efluente do Controle 10; Ensaio 11': Efluente do Ensaio 11; Controle 11': Efluente do Controle 11; Ensaio 12': Efluente do Ensaio 12 e Controle 12': Efluente do Controle 12.

A geração mais elevada de CH₄ no ensaio 11' (Figura 5.17) se deveu à concentração inicial de ácido acético advindo do sistema fermentativo. Ao final do ensaio 10 foi gerado 650,00 mg L⁻¹ de ácido acético e para o ensaio 11, 248,00 mg L⁻¹ do mesmo ácido (Tabela 5.8). Assim, microrganismos metanogênicos consumidores de acetato, como *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, que foram identificados no inóculo II *in natura* (Figura 5.9), poderiam ter sido os responsáveis pela remoção desse ácido, o que ocasionou a elevada geração de CH₄ para o ensaio 10'.

Figura 5.17 - Geração de CH_4 (mmol L^{-1}) nos ensaios 10', 11' e 12' operados com o inóculo II *in natura*.



Ensaio 10': Efluente do Ensaio 10; Ensaio 11': Efluente do Ensaio 11; Ensaio 12': Efluente do Ensaio 12.

O ensaio 12' gerou menos CH_4 e em tempo reduzido, quando comparado aos ensaios 10' e 11'. Isso pode ser justificado pela ausência de meio nutricional sintético, como o meio PYG modificado, sendo disponível nesse ensaio uma concentração reduzida de matéria orgânica, ocasionando elevada taxa de DQO removida.

Vale ressaltar as elevadas remoções de metanol para todos os ensaios. Assim como observado anteriormente, o consórcio microbiano pertencente ao inóculo II *in natura* foi capaz de degradar este composto tóxico, gerando ao final da operação dos reatores um efluente com concentrações reduzidas de metanol.

Os processos anaeróbios em dois estágios sequenciais são identificados, portanto, como métodos promissores, tendo em vista que reduzem o teor de matéria orgânica e aumentam a eficiência geral de conversão de energia pela geração de CH_4 , mesmo em elevadas concentrações (SILVA et al., 2018).

5.5 Comparação com outros estudos

O presente estudo foi pioneiro na área, sendo que as condições estabelecidas para todos os ensaios se mostraram inéditas. Dessa forma, a comparação com trabalhos na literatura se tornou dificultosa, uma vez que os estudos nestas configurações são escassos (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Comparação dos estudos com reaproveitamento do glicerol codigeridos em outros substratos, operados em reatores em batelada.

Substratos	Inóculo	Condições		Rendimento	Ref.
		Temp. (°C)	pH		
20 g L ⁻¹ de glicerina P.A. e 20 g L ⁻¹ de melão de cana-de-açúcar	<i>K. pneumoniae</i>	37	6,0	81,2 g 1,3-PD L ⁻¹	(OH et al., 2013)
22 g L ⁻¹ de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel e 8 g L ⁻¹ de hidrolisado do bagaço da mandioca	<i>P. shermanii</i>	32	6,5	17 g ácido propiônico L ⁻¹	(WANG; YANG, 2013)
1,8 mL glicerol bruto proveniente da produção e biodiesel a partir de óleos vegetais, 10 g L ⁻¹ resíduo alimentar	Lodo granular de estação de tratamento de esgoto	35	5,5 e 7,0	179,3 mL H ₂ g ⁻¹ STV e 343,0 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	(SILVA et al., 2018)
80 g L ⁻¹ glicerina P.A., 10 g L ⁻¹ glicose	<i>E. coli</i> BL21-dhaT	37	6,8	41.65 g 1,3-PD L ⁻¹	(YUN et al., 2021)
5 g DQO L ⁻¹ GBR e 5 g DQO L ⁻¹ VC (Ensaio 1)				400,00 mL H ₂ g ⁻¹ STV e 972,00 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	
10 g DQO L ⁻¹ GBR e 10 g DQO L ⁻¹ VC (Ensaio 2)				1833,33 mL H ₂ g ⁻¹ STV e 1368,00 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	
20 g DQO L ⁻¹ GBR e 20 g DQO L ⁻¹ VC (Ensaio 4)				1,92 g 1,3-PD L ⁻¹	
5 g DQO L ⁻¹ de GBRT e 5 g DQO L ⁻¹ de VC (Ensaio 10)	Cultura mista com predomínio de <i>Clostridium</i> sp.	37	5,5	1350,00 mL H ₂ g ⁻¹ STV e 1052,67 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	Presente estudo
5 g DQO L ⁻¹ de GBV e 5 g DQO L ⁻¹ de VC (Ensaio 11)				2,73 g ácido propiônico L ⁻¹ ; 633,33 mL H ₂ g ⁻¹ STV e 1238,00 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	
5 g DQO L ⁻¹ de GBR, 5 g DQO L ⁻¹ de VC e esgoto sanitário (Ensaio 12)				408,33 mL H ₂ g ⁻¹ STV e 657,33 mL CH ₄ g ⁻¹ STV	

VC: vinhaça citrícola;

GBR: glicerol bruto de óleos residuais domésticos;

GBRT: glicerol bruto de óleos residuais domésticos pré-tratado e

GBV: glicerol bruto de óleos animais e vegetais.

OH et al., (2013) investigaram a produção de 1,3-PD a partir da cofermentação de glicerina P.A. em glicose utilizando cepas de *K. pneumoniae*. Para tornar a produção de 1,3-PD mais econômica, os autores utilizaram melão da cana-de-açúcar não tratado como cosubstrato

rico em glicose para a fermentação com glicerol. O experimento foi conduzido em batelada, a 37 °C, alimentado com 20 g L⁻¹ de glicerina P.A. e 20 g L⁻¹ de melaço, com gerações de 81,2 g L⁻¹ de 1,3-PD (Tabela 5.9). Essa elevada produção de 1,3-PD esteve atrelada à utilização de cepas de *K. pneumoniae* que através da recombinação genética foram conduzidas a produzir especificamente 1,3-PD, acarretando a elevação do rendimento deste produto. Além disso, a utilização de glicerina P.A., livre de contaminantes, possibilitou a ausência de interferentes na atividade microbiológica. No presente estudo, o ensaio 4, operado sob concentrações próximas de substratos, alimentado com 20 g DQO L⁻¹ de GBR e 20 g DQO L⁻¹ de VC, ambos carregados de contaminantes, e que mesmo nessas condições mais impróprias à atividade microbiológica, foram obtidos rendimentos satisfatórios de 1,92 g 1,3-PD L⁻¹ (Tabela 5.9), elucidando a capacidade de culturas mistas em digerir substratos carregados de interferentes.

WANG; YANG, (2013) avaliaram a codigestão de glicerol/glicose para a geração de ácido propiônico por meio da cultura pura *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Os autores utilizaram 22 g L⁻¹ de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel e 8 g L⁻¹ de hidrolisado do bagaço da mandioca como fonte de glicose, em reator em batelada, a 32 °C, gerando 17 g ácido propiônico L⁻¹ (Tabela 5.9). No presente estudo, a maior produção de ácido propiônico foi alcançada no ensaio 11 com 5 g DQO L⁻¹ de GBV e 5 g DQO L⁻¹ de VC, sendo gerado 2,73 g L⁻¹ (Tabela 5.9), em condições mais robustas com resíduos usados como substratos e em concentrações mais reduzidas, sendo possível obter elevado rendimento de ácido propiônico.

SILVA et al., (2018) estudaram as gerações de H₂ e CH₄ a partir da codigestão de glicerol bruto com resíduo alimentar e lodo granular (com as concentrações destes dois últimos mantidas em 10 g L⁻¹) em sistemas anaeróbios de dois estágios sequenciais, acidogênese seguida da metanogênese, sob condições mesofílicas (35 °C). O efeito da adição de glicerol (1 e 3 % v/v) foi avaliado, sendo que os autores obtiveram a maior geração de H₂ para o ensaio que tinha a maior concentração de glicerol bruto (3 %) (179,3 mL H₂ g⁻¹ STV) (Tabela 5.9). Segundo os autores, a maior geração de H₂ pôde ser atribuída a vários fatores, como o aumento de matéria orgânica facilmente assimilável e o fornecimento de nutrientes e micronutrientes (fósforo, nitrogênio, cálcio e outros), que puderam ter estimulado bactérias produtoras de H₂. O aumento da carga orgânica com a adição de glicerol impactou positivamente a geração deste biogás, acelerando o crescimento bacteriano e conseqüentemente a hidrólise dos substratos, maximizando a produtividade de H₂. Além disso, foi demonstrado o efeito benéfico da codigestão quando comparado ao experimento controle (94,6 mL H₂ g⁻¹ STV) dos autores, levando em consideração o efeito sinérgico entre esses os substratos. Para o ensaio no segundo

estágio, os autores obtiveram a maior geração de CH₄ (343,0 mL CH₄ g⁻¹ STV) para o efluente advindo do sistema fermentativo com a adição de 1 % de glicerol. Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 5.9) foram superiores aos encontrados pelos autores para os biossistemas em dois estágios sequenciais. Assim, os ensaios 1, 2, 10, 11 e 12 apresentaram elevados rendimentos tanto de H₂ como de CH₄ (Tabela 5.9). Apesar dos autores verificarem os benefícios da codigestão do glicerol bruto com resíduo alimentar e lodo granular, no presente estudo foi observado que mesmo em condições mais restritivas como na presença de substratos carregados de contaminantes, como o GBR, GBV, GBRT e VC, conforme discutido nas seções anteriores, foi possível atingir elevados rendimentos nas duas fases para a codigestão em biossistemas integrados.

YUN et al., (2021) utilizaram a codigestão glicerol-glicose como forma de aumentar a produtividade de 1,3-PD utilizando cepas de cultura pura de *Escherichia coli*. O experimento foi conduzido em um biorreator em batelada (10 L) alimentado com 10 g L⁻¹ de glicose e 80 g L⁻¹ de glicerina P.A, a 37 °C, sob agitação de 200 rpm e pH mantido em 6,8, sendo produzidos 41,65 g L⁻¹ 1,3-PD (Tabela 5.9). A maior geração de 1,3-PD no presente estudo foi para o ensaio 4, 1,91 g 1,3-PD L⁻¹, na presença de 20 g DQO L⁻¹ de GBR codigerido em 20 g L⁻¹ de VC. Esta diferença pode ser dada a partir de alguns fatores, como a presença de um glicerol advindo de um processo de obtenção de biodiesel, no qual contém uma elevada carga de impurezas que poderiam interferir na atividade metabólica, além da utilização de uma cultura mista. Como os autores usaram uma cultura pura com recombinações genéticas, era esperado que o rendimento de 1,3-PD fosse elevado, já que este microrganismo especificamente metabolizou os substratos para formar exclusivamente este produto. Mesmo nas condições mais robustas e de operação simplificada impostas no presente estudo, foi possível ainda assim gerar uma concentração significativa de 1,3-PD em 1,91 g L⁻¹.

5.6 Geração de biogás em reator de escala aumentada

A Tabela 5.10 apresenta os resultados obtidos ao final de cada ensaio de codigestão no reator operado com o inóculo II *in natura*. Assim como os ensaios anteriores no 2º estágio (metanogênico), para este reator de escala aumentada também houve a remoção total de metanol proveniente do GBR. O inóculo II *in natura* se mostrou capaz de consumir este tóxico em todas as condições trabalhadas, apresentando resultados promissores para a degradação deste composto.

Tabela 5.10 - Resultados de operação do reator em batelada em escala aumentada para 9 condições distintas (ensaios de A a I), na presença do inóculo II *in natura*, à temperatura ambiente.

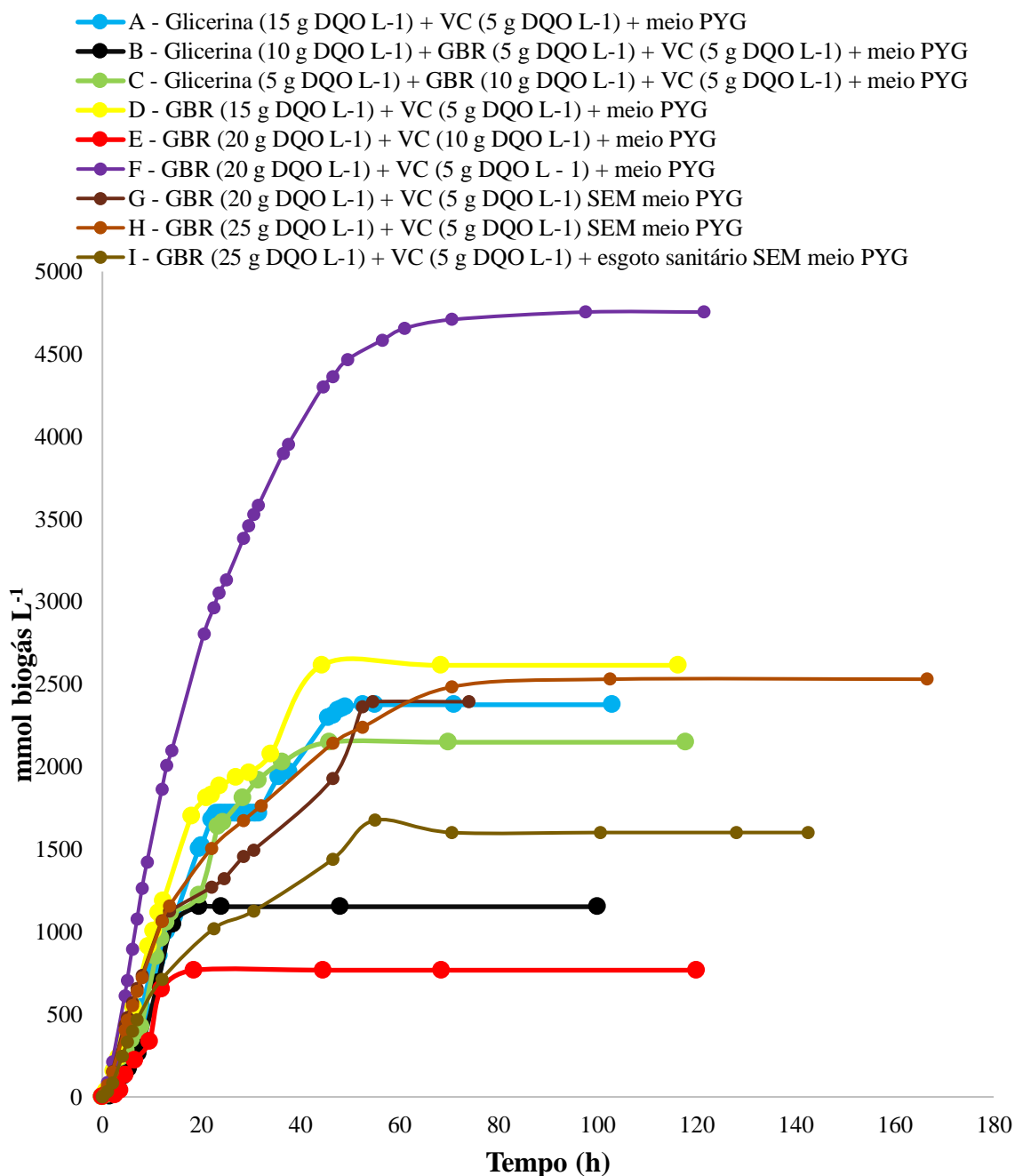
Parâmetros	Ensaio								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Tempo de operação dos reatores (h)	103	100	237,8	116,3	120	241,5	74	166,5	142
Remoção de glicerol (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Remoção de glicose (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Remoção de DQO (%)	100	100	100	100	84	100	100	100	100
pH Inicial	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
pH Final	7,50	7,45	7,50	7,56	7,62	7,50	7,50	7,33	7,56
Remoção de metanol (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Geração máxima de biogás (mmol L ⁻¹)	2376,06	1152,39	2148,76	2614,78	767,85	4754,74	2393,96	2530,64	1601,90
Rendimento de biogás (mmol biogás DQO ⁻¹ removida)	69,88	33,89	63,20	76,90	22,58	139,84	95,76	84,35	53,40

Ensaio A: Glicerina (15 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹) + meio PYG modificado; Ensaio B: Glicerina (10 g DQO L⁻¹) + GBR (5 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹) + meio PYG modificado; Ensaio C: Glicerina (5 g DQO L⁻¹) + GBR (10 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹) + meio PYG modificado; Ensaio D: GBR (10 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹) + meio PYG modificado; Ensaio E: GBR (20 g DQO L⁻¹) + VC (10 g DQO L⁻¹) + meio PYG modificado; Ensaio F: GBR (20 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹) + meio PYG modificado; Ensaio G: GBR (20 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹); Ensaio H: GBR (25 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹); Ensaio I: GBR (25 g DQO L⁻¹) + VC (5 g DQO L⁻¹) + esgoto sanitário. VC: vinhaça citrícola; GBR: glicerol bruto de óleos residuais domésticos.

Para os ensaios de A a I, todos os substratos (glicerina P.A., GBR e VC) foram consumidos em sua totalidade o que refletiu diretamente na remoção de DQO (Tabela 5.10). Assim, a degradação via direta do GBR e VC para a redução da matéria orgânica total se mostrou eficaz no reator de escala aumentada. Mesmo para os ensaios na ausência de meio nutricional sintético (meio de cultivo PYG modificado) (ensaios G, H e I), os substratos adicionados foram consumidos em sua totalidade. Isso conferiu um caráter adaptativo dos microrganismos, mostrando resistência aos meios de cultivo mais robustos, sendo possível atingir a eficiência de degradação.

A figura 5.18 representa a evolução da geração de biogás mediante os incrementos de GBR codigerido em VC para os ensaios de A e I.

Figura 5.18 - Geração de biogás (mmol L^{-1}) no reator de escala aumentada operado com o inóculo II *in natura*.



As análises de cromatografia gasosa do *headspeace* indicaram que ao final de todos os ensaios a composição do biogás era de aproximadamente 80 % de CH_4 e 20 % de CO_2 . As diferenças quanto às gerações de biogás foram provenientes das concentrações de substratos no meio de cultivo. O ensaio A, que continha glicerina P.A. e VC, gerou elevada concentração de biogás ($2376,06 \text{ mmol L}^{-1}$) (Tabela 5.10), tendo em vista que a ausência de GBR proporcionou

um meio de cultivo com redução de interferentes para a atividade microbiológica, facilitando a remoção dos substratos e elevando a geração de biogás.

Para o ensaio B, o início da adição de GBR no reator provocou uma queda acentuada na geração de biogás quando comparado ao ensaio A. Os contaminantes do GBR interferiram na rota metabólica de geração de biogás. Assim, a adição de GBR provocou a redução de biogás para 1152,39 mmol L⁻¹ gerados (Tabela 5.10) (Figura 5.18).

Em relação ao ensaio C, o incremento de GBR em substituição à glicerina P.A. foi responsável por uma maior geração de biogás (2148,76 mmol L⁻¹) quando comparado ao ensaio B. Isso indicou a adaptação dos microrganismos ao meio contendo GBR, voltando a apresentar uma elevada geração de biogás, próxima ao ensaio A. Além disso, segundo RODRIGUES et al., (2020a), a concentração de metanol presente no GBR poderia ter melhorado a permeabilidade celular microbiana, ocasionando o aumento da taxa de utilização de outros substratos na célula, como o acetato, o que elevou a geração de biogás (Tabela 5.10).

No ensaio D, a glicerina P.A. foi substituída por GBR. Desse modo, a geração de biogás (2614,78 mmol L⁻¹) foi superior ao ensaio A que continha glicerina. Segundo SILVA et al., (2017), a adição de GBR causa o aumento de impurezas como os ácidos graxos voláteis, que favorecem a produção de ácido acético. Dessa forma, o aumento da concentração de GBR no ensaio D sugeriu modificações na rota metabólica, ocasionando o aumento da concentração de ácido acético, como observado por RODRIGUES et al., (2020b), que foi prontamente assimilável pelas arqueias metanogênicas sendo responsável pelo aumento do biogás produzido.

Para o ensaio E, as concentrações de GBR e VC foram de 20 g DQO L⁻¹ e 10 g DQO L⁻¹, respectivamente. O aumento simultâneo da concentração dos dois substratos acarretou uma menor concentração de biogás gerado (767,85 mmol L⁻¹) (Tabela 5.10 e Figura 5.18). O ensaio F, em que foi aumentada somente a concentração de GBR (20 g DQO L⁻¹) e mantida a concentração de VC (5 g DQO L⁻¹) em relação ao ensaio D, gerou a maior concentração de biogás para todos os experimentos realizados. Isso indicou que a VC apresentou um maior efeito inibitório, quando em concentração elevada, para obtenção de biogás. De acordo com TORQUATO et al., (2017), a VC contém uma grande quantidade de sólidos, substâncias inorgânicas e uma variedade de compostos recalcitrantes como o fenol e furfural. WANG et al., (2020a) demonstrou o efeito negativo de fenóis na geração de CH₄, sendo um composto tóxico que interfere diretamente na digestão anaeróbia. Segundo os autores, tanto o crescimento de *Clostridia* quanto de *Petrimonas* foram suprimidos pelos compostos fenólicos. Conforme discutido nas seções anteriores, esses microrganismos foram encontrados no inoculo II *in*

natura, usado também neste reator em escala aumentada. Provavelmente a atividade destes dois microrganismos foram suprimidas pelo excesso de VC e tal reação sintrófica sofreu alterações já que esses são produtores de acetato, refletindo, posteriormente, na geração de CH₄ reduzida.

Os ensaios seguintes (G, H e I) foram operados na ausência de meio PYG modificado, a fim de reduzir custos operacionais e verificar a viabilidade de geração de biogás (SARMA et al., 2013). Era esperada a redução de biogás no ensaio G em relação do ensaio F. O meio PYG fornece concentrações de nitrogênio que são altamente requeridas nos processos de digestão anaeróbia. Ainda assim, foi possível obter uma elevada concentração de biogás (2393,96 mmol L⁻¹), sendo esta muito próxima à obtida para o ensaio A (Figura 5.18). Portanto, a concentração de 20 g DQO L⁻¹ de GBR codigerido em 5 g DQO L⁻¹ de VC sem a presença de meio nutricional sintético foi capaz de gerar biogás além de reduzir completamente a matéria orgânica e remover o metanol presente no GBR.

No ensaio H foi aumentada a concentração de GBR para 25 g DQO L⁻¹, sendo mantida a concentração de VC. O acréscimo de GBR permitiu que fosse aumentada a geração de biogás. Segundo SARMA; DUBEY; MOHOLKAR, (2016), íon Na⁺, presente no glicerol bruto, possui efeito benéfico na fermentação do glicerol, uma vez que constrói uma bomba de Na-K-enzima ATP, trabalhando para o transporte mais rápido de nutrientes e substratos, como o glicerol, através da membrana para a região intracelular, o que essencialmente melhora as reações enzimáticas no metabolismo do glicerol, elevando a geração de biogás. Assim, no presente estudo, o GBR foi obtido por meio da reação de transesterificação utilizando o NaOH como catalisador. O íon Na⁺ que permaneceu na fase glicerínica (dado pelo valor do teor de cinzas = 34,57 %) provavelmente poderia ter contribuído com o aumento da geração de biogás já que para o ensaio H a concentração de GBR foi aumentada, aumentando, portanto, a concentração de Na⁺, o que justificou a maior geração de biogás quando comparado ao ensaio G.

Diferentemente ao observado para os ensaios anteriores, o ensaio I apresentou uma queda na geração de biogás (1601,90 mmol L⁻¹) (Tabela 5.10), dada pela adição de esgoto sanitário. Provavelmente, o sistema que estava em equilíbrio se desregulou pela adição deste outro substrato, interferindo na dinâmica microbiana previamente estabelecida para as condições anteriores.

Novamente cabe ressaltar a elevação do pH ao final dos ensaios metanogênicos, o que sugere que a remoção da matéria orgânica foi acompanhada pela remoção de ácidos graxos livres, diminuindo as concentrações de H⁺ livres no meio de cultivo.

5.7 Comparação da comunidade microbiana frente às condições impostas para o inóculo II.

Ao longo dos ensaios desenvolvidos neste estudo para o inóculo II, 3 tipos de amostras foram obtidas e identificadas por técnicas de biologia molecular. Após a identificação, as sequências foram submetidas ao NCBI pelo número “Sequence Read Archive” (SRA) SRP191566. O número de acesso do projeto foi PRJNA531496. O número de acesso após cada estágio está descrito abaixo:

Amostra 1- identificação de bactérias presentes no inóculo II *in natura*: número de acesso SAMN11360216 (Inoculum used for anaerobic Codigestion of the crude glycerol) e determinação de arqueias: número de acesso SAMN11375072 (Archae Inoculum used for anaerobic Codigestion of the crude glycerol).

Amostra 2- identificação de bactérias presentes no inóculo II após o pré-tratamento ácido: número de acesso SAMN11360223 (Consortium by acid pre-treatment to H₂-generating microorganisms).

Amostra 3- identificação de bactérias presentes no inóculo II após o final dos ensaios de codigestão (ensaio 9): número de acesso SAMN11360224 (Final consortium of co-digestion tests of crude glycerol for H₂ generation).

O total de 317.330, 360.249 e 366.684 sequências para as amostras 1, 2 e 3 foram obtidas com índice de similaridade de 97 %, sendo atribuídas 1508, 1487 e 1185 OTUs, respectivamente (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 - Parâmetros de similaridade para as amostras 1, 2 e 3 do inóculo II.

Amostras	Número de sequencias	OTU	Shannon	chao-1
1	317.330	1508	7,620	2.577.744
2	360.249	1487	4,846	1.514.036
3	366.684	1185	3,670	1.158.814

A redução no número de OTUs observada para as amostras 2 e 3 comparadas com a amostra 1 se deveu à sequência de processos ocorridos no inóculo após o pré-tratamento (amostra 2) com a posterior inserção a um meio de cultivo contendo resíduos (amostra 3), sendo verificada a seleção microbiana. Segundo RODRIGUES et al., (2019a), o inóculo que passou

por processos de pré-tratamentos apresentou uma redução da abundância relativa das espécies com a consequente diminuição das taxas de OTUs.

O índice Shannon indica a diversidade microbiana enquanto que o chao-1 representa o estimador de riqueza da comunidade microbiana (RODRIGUES et al., 2020b). Valores reduzidos nesses índices foram verificados nos inóculos pré-tratados (amostra 2) e após a operação dos reatores em codigestão (amostra 3) (Tabela 5.11). Ao final da codigestão glicerol/glicose, a reduzida diversidade microbiana para o inóculo II se deveu à seleção de grupos específicos capazes de sobreviver ao ensaio em questão, sugerindo que uma faixa estrita de população de bactérias foi favorecida, inibindo outras populações. À esta seleção poderiam ter sido atribuídas as elevadas concentrações de substratos, uma vez que a amostra 3 foi analisada após a montagem do ensaio 9 na concentração de 40 g DQO L⁻¹ de resíduos, bem como na presença dos contaminantes nos resíduos GB e VC usados no ensaio, restringindo a diversidade microbiana.

RATTI et al., (2015) observaram em seus estudos as diferenças dos índices Shannon com o aumento da concentração de substrato ao meio de cultivo. Os autores estudaram a composição e diversidade da comunidade microbiana proveniente do lodo granular do reator UASB termofílico do tratamento de águas residuárias, usado na operação de reatores anaeróbios em batelada para a produção de H₂ a partir de glicose a 55 °C. Os experimentos foram conduzidos usando 0,5 e 2,0 g L⁻¹ de glicose, obtendo-se os índices Shannon de 5,25 e 5,00, respectivamente. O aumento na concentração de substrato promoveu a seleção microbiana, levando à diminuição da diversidade, onde um grupo específico de microrganismos foram capazes de sobreviver nesta condição, como verificado no presente estudo.

Quanto às amostras 1 e 2, a diferença para o índice Shannon (7,620 e 4,846, respectivamente) (Tabela 5.11) foi devido ao pré-tratamento no qual o inóculo *in natura* foi submetido. Sendo assim, ocorreu a seleção de microrganismos que conseguiram sobreviver à condição estrita imposta pelo pré-tratamento ácido.

YANG; WANG, (2018) avaliaram a diferença dos pré-tratamentos ao inóculo proveniente de uma estação de tratamento de águas residuárias. Os autores concluíram que os pré-tratamentos ocasionaram um elevado impacto na diversidade da comunidade microbiana a partir da fermentação de azevém para a obtenção de H₂. A amostra pré-tratada com radiação gama apresentou a maior diversidade de comunidade (2,214) entre a aeração (2,039) e ataque ácido (1,924), devido à propriedade dos endósporos que apresentaram baixo conteúdo de água, sendo reduzido o efeito de dano dos radicais reativos induzidos pela radiação ionizante. Todavia, no presente estudo, a amostra 2 após o ataque ácido ainda assim apresentou um índice

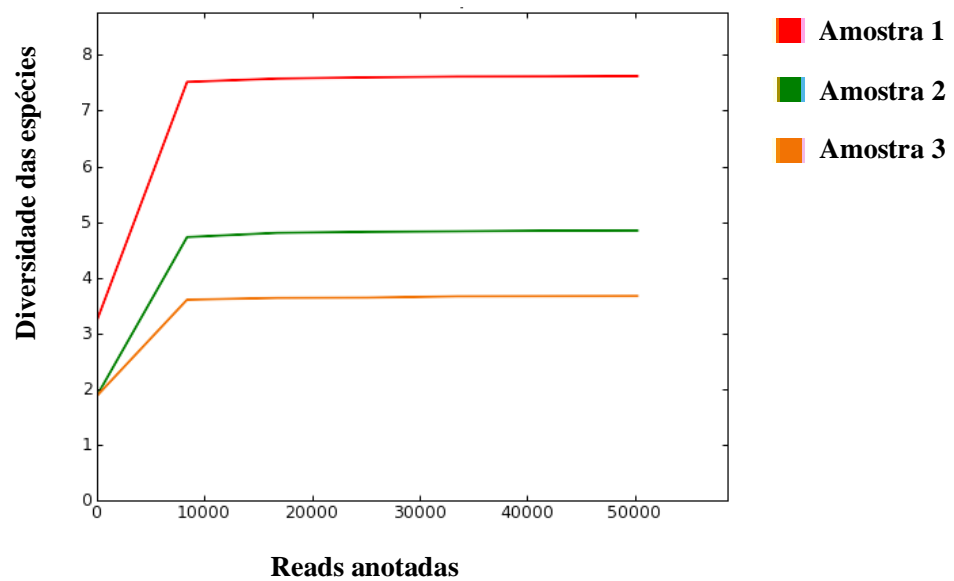
Shannon superior ao trabalho de Yang & Wang (2018), provavelmente devido à composição do meio de cultivo genérico, meio PYG, enquanto o meio de cultivo para os reatores fermentativos dos autores foi alimentado com uma solução de nutrientes específica, provocando a seleção da comunidade microbiana, diminuindo-se assim o índice Shannon.

YANG; WANG; SHEN, (2019) estudaram a produção de H₂ a partir da fermentação de resíduos contendo antibióticos, avaliando-se diferentes tipos de pré-tratamentos para o inóculo coletado de uma estação de tratamento de esgoto. Os autores obtiveram diferenças significativas da comunidade microbiana para os diferentes tipos de pré-tratamentos. O índice Shannon para o controle (inóculo sem pré-tratamento) foi de 3,48, enquanto após os pré-tratamentos básico, ácido e choque térmico foram de 2,45, 1,66 e 1,98, respectivamente. Segundo os autores, diferentes pré-tratamentos do inóculo levaram a diferentes estruturas da comunidade microbiana devido às respostas dos microrganismos frente às condições extremas impostas. A diferença da diversidade microbiana para o controle quando comparado ao ataque ácido indicou que houve a seleção de microrganismos, assim como observado no presente estudo com as amostras 1 e 2, por exemplo.

A riqueza da comunidade microbiana dada pelo estimador chao-1 diminuiu nas amostras 2 e 3 quando comparadas à amostra 1. Ou seja, ocorreu uma seleção no pré-tratamento ácido e operação dos ensaios na presença dos resíduos.

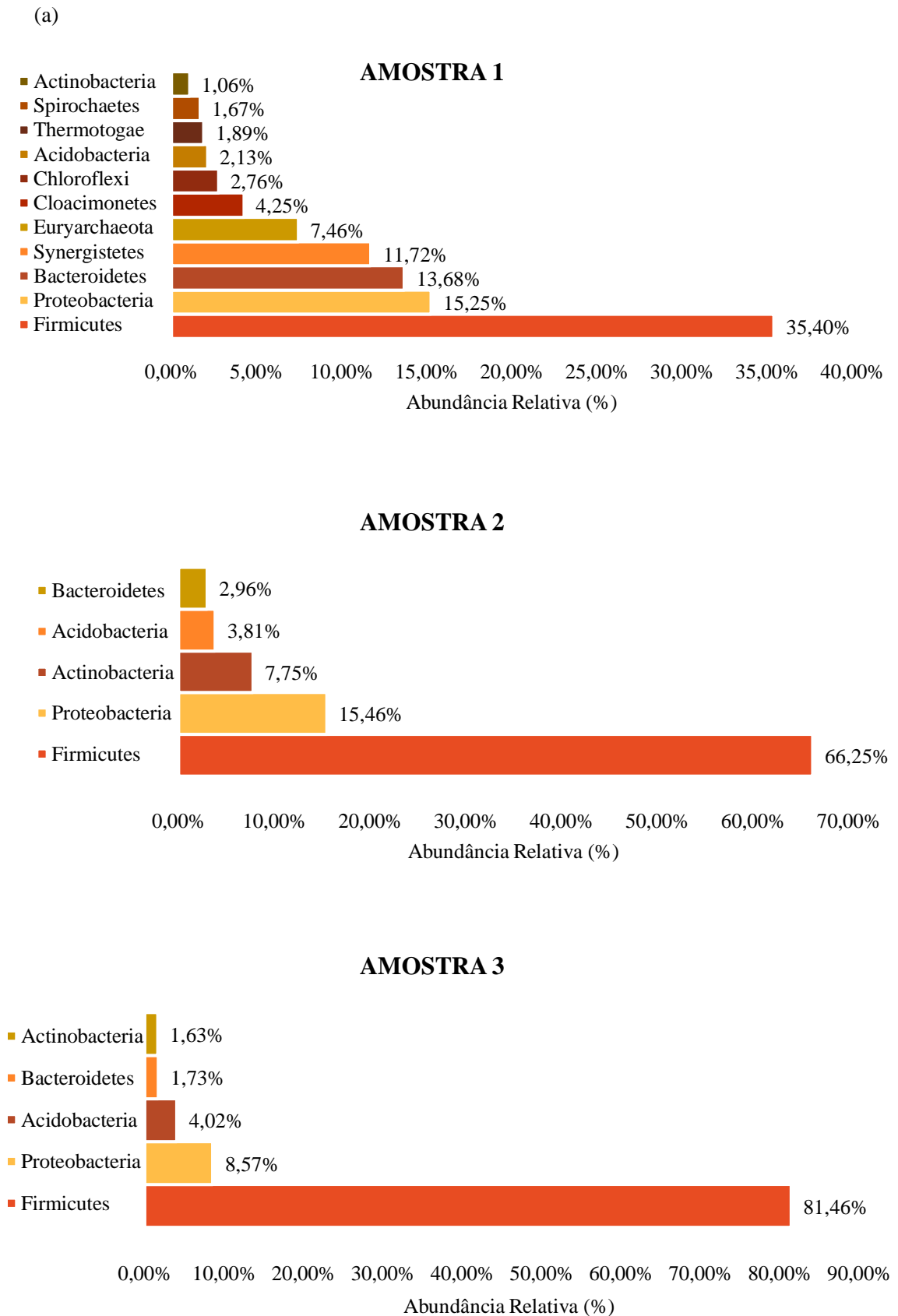
As curvas de rarefação atingiram o platô após aproximadamente 1000 sequências, apresentando estabilização (Figura 5.19). De acordo com RODRIGUES et al., (2019a) o número de sequências foi suficiente para cobrir toda a diversidade bacteriana. Além disso, como a curva tornou-se relativamente plana com o aumento do número de sequências, é garantido que houve precisão dos resultados.

Figura 5.19 - Curvas de rarefação para as amostras 1, 2 e 3.

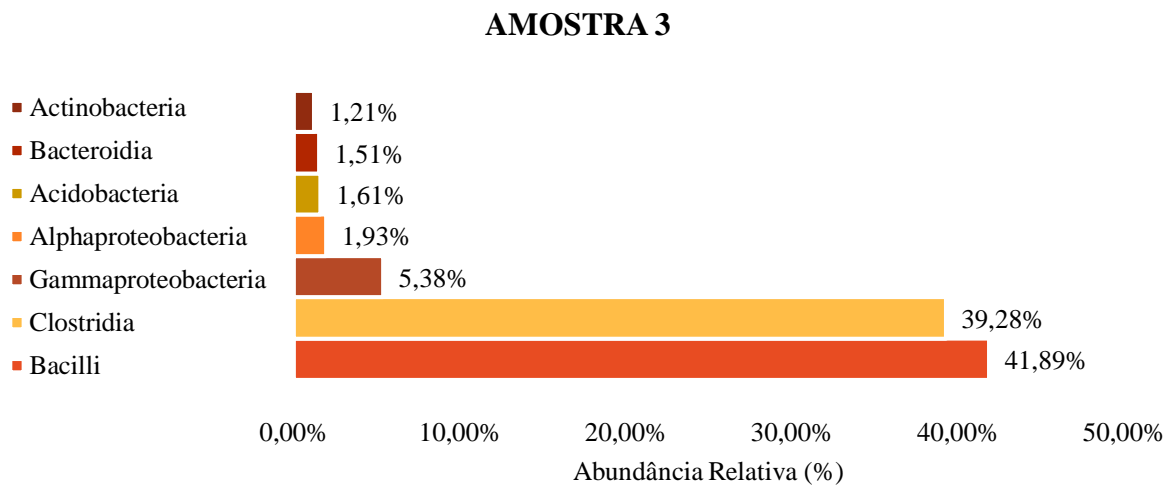
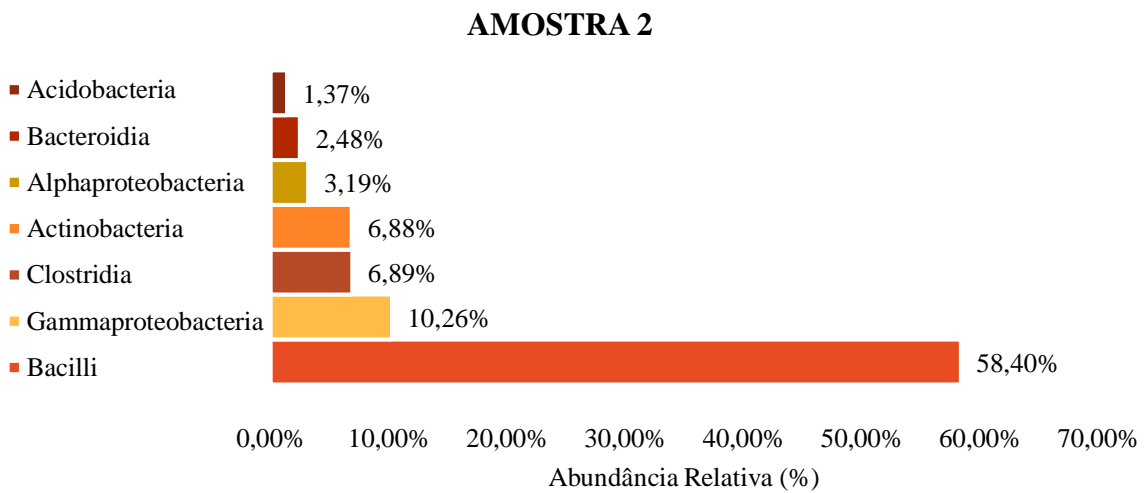
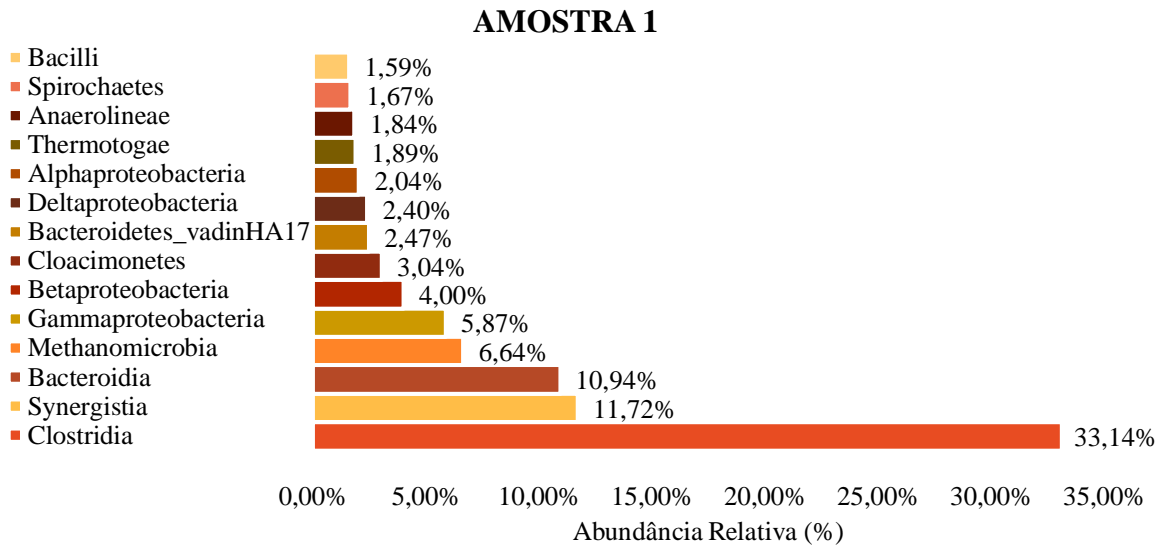


Abundâncias relativas mais elevadas para cada domínio estão apresentadas na Figura 5.20, a qual ilustra as alterações sofridas na comunidade microbiana após a ocorrência de cada processo, iniciando com a microbiota *in natura* (amostra 1), passando pelo pré-tratamento ácido (amostra 2) e ao final do ensaio 9 de codigestão com os resíduos GBR e VC (amostra 3).

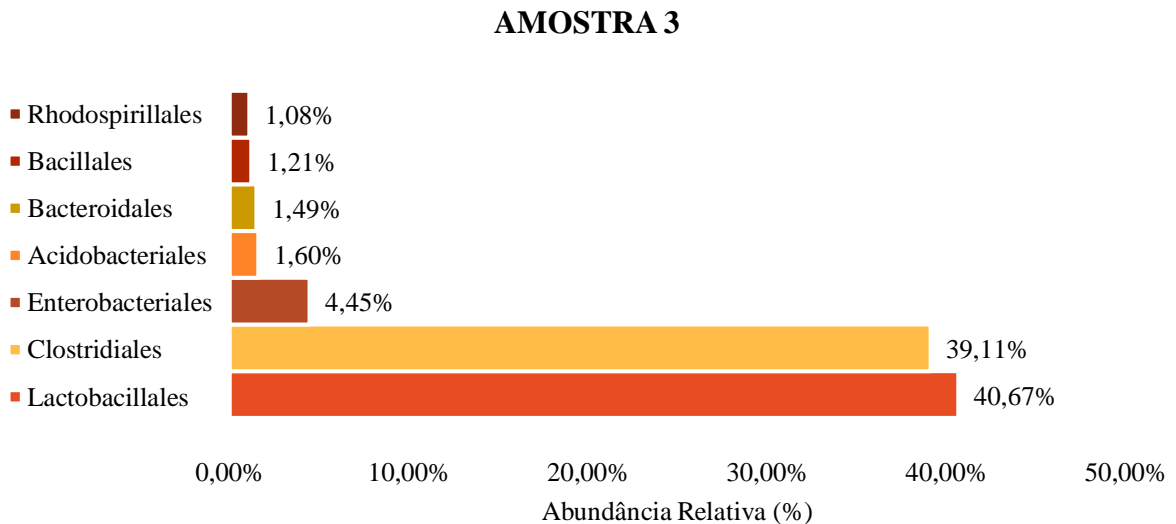
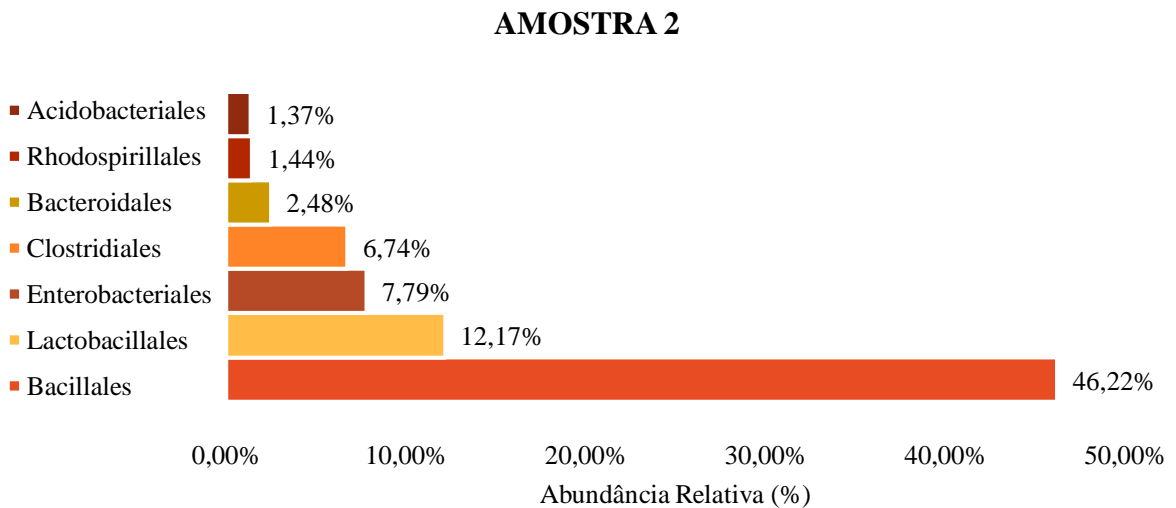
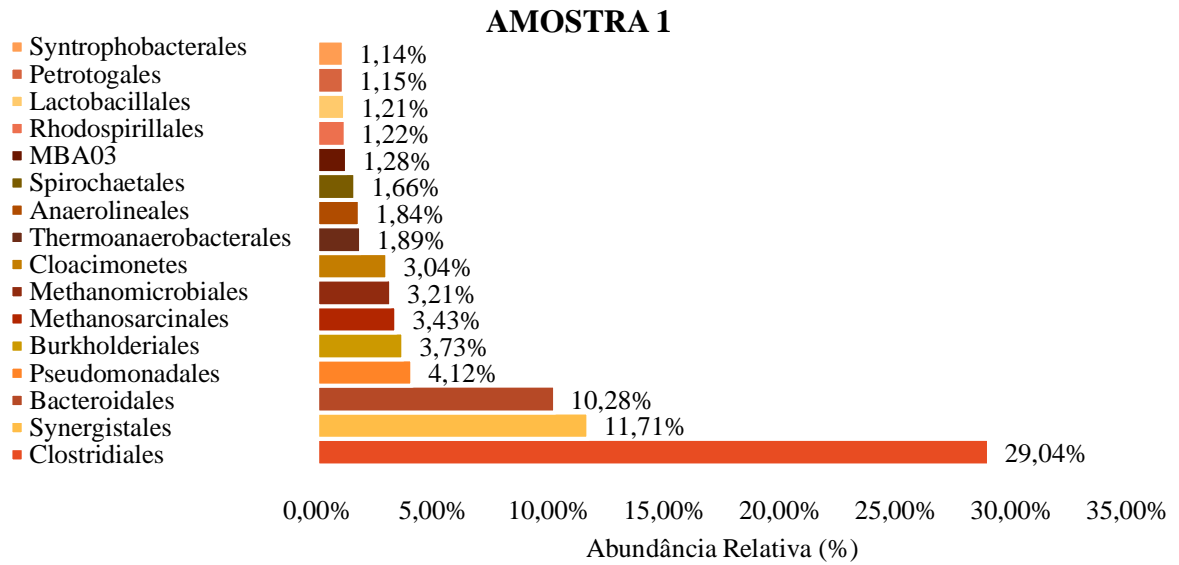
Figura 5.20 - Abundâncias relativas para as amostras 1, 2 e 3, (a) filo, (b) classe, (c) ordem, (d) família, (e) gênero e (f) espécie.



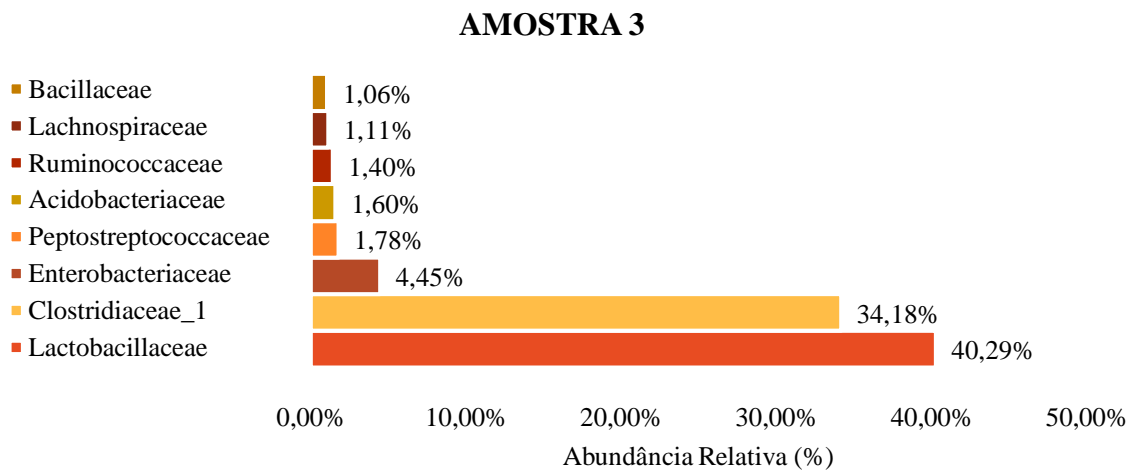
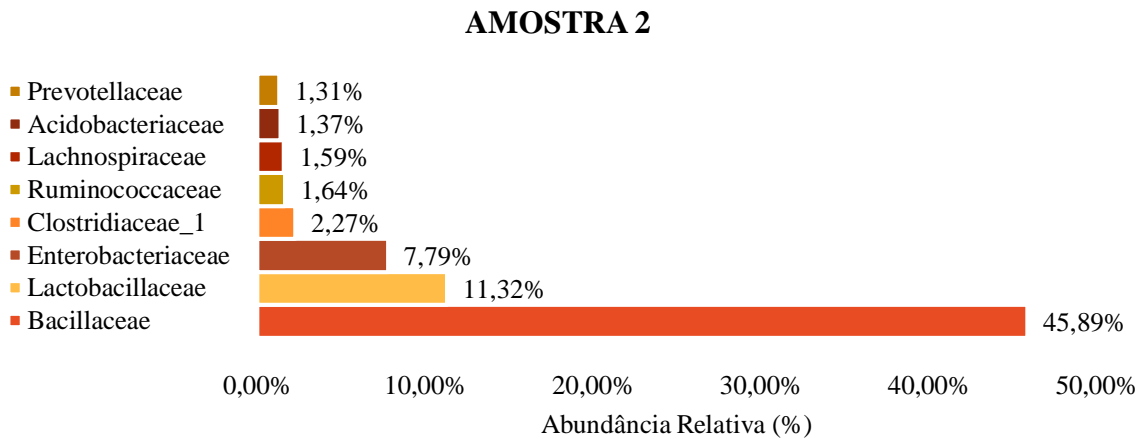
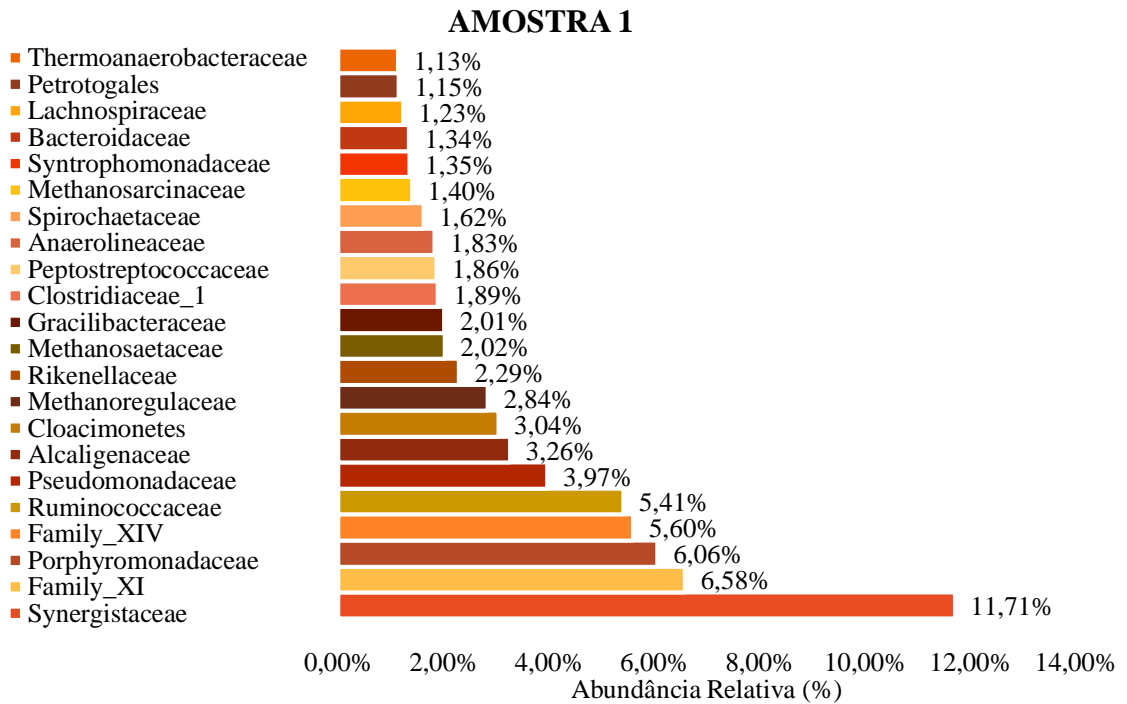
(b)



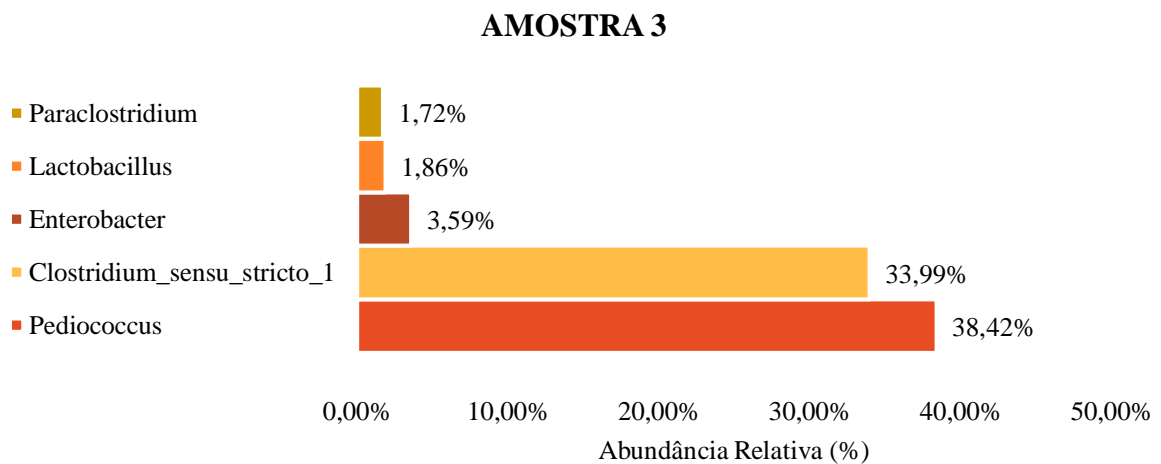
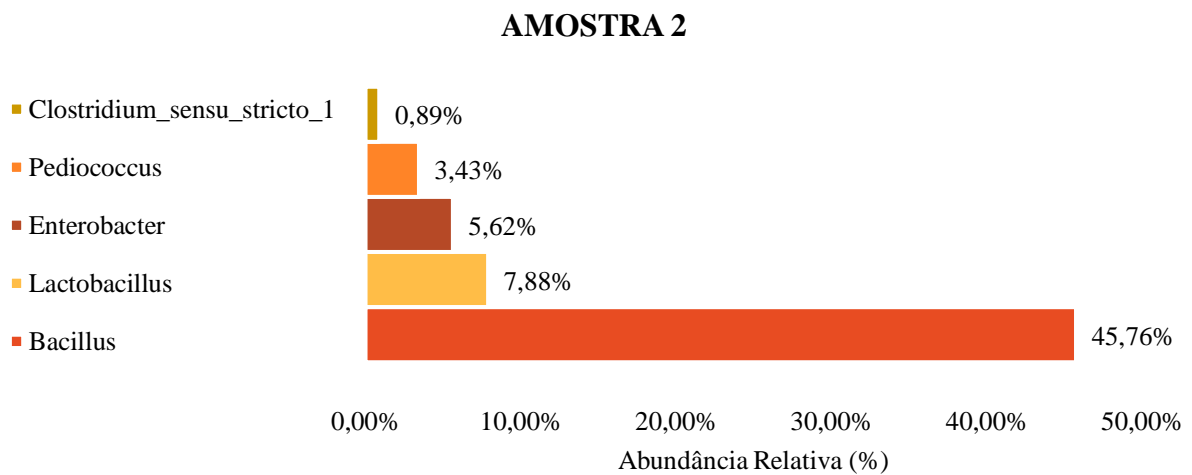
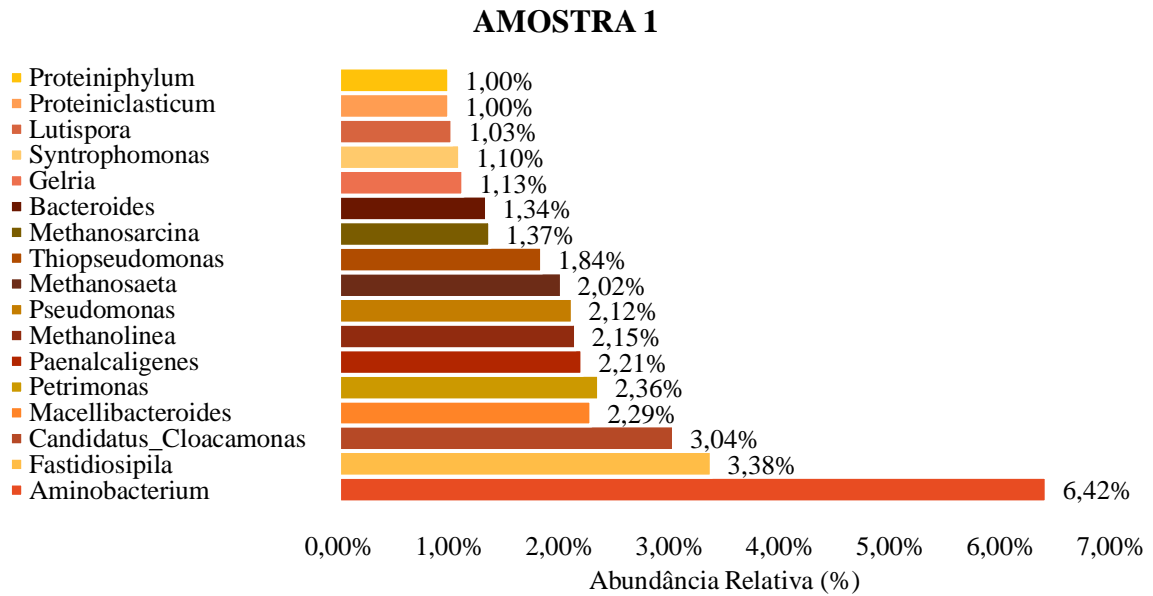
(c)



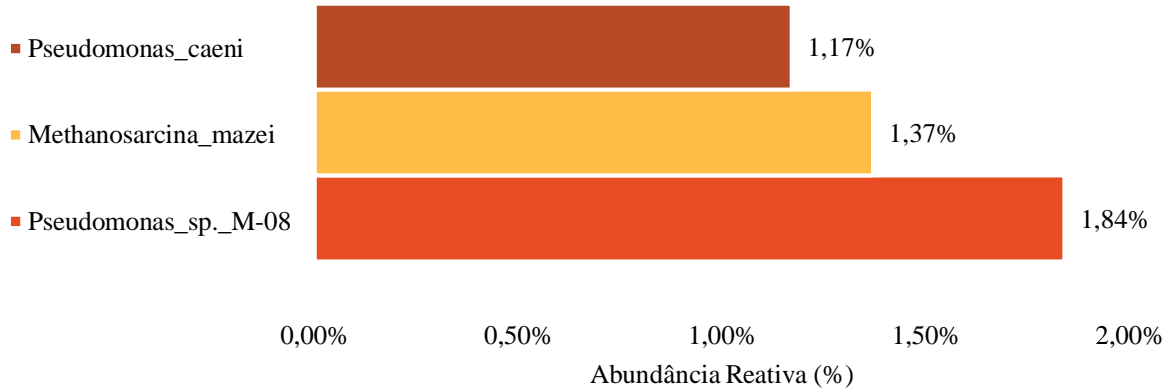
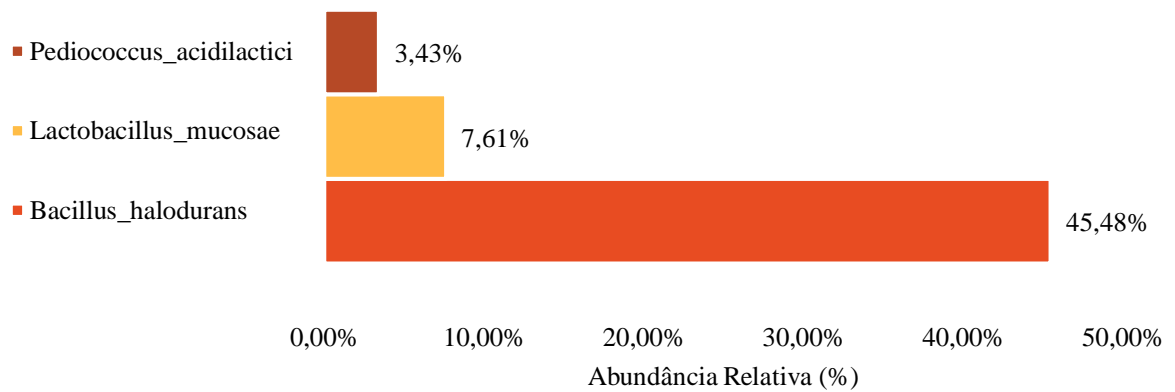
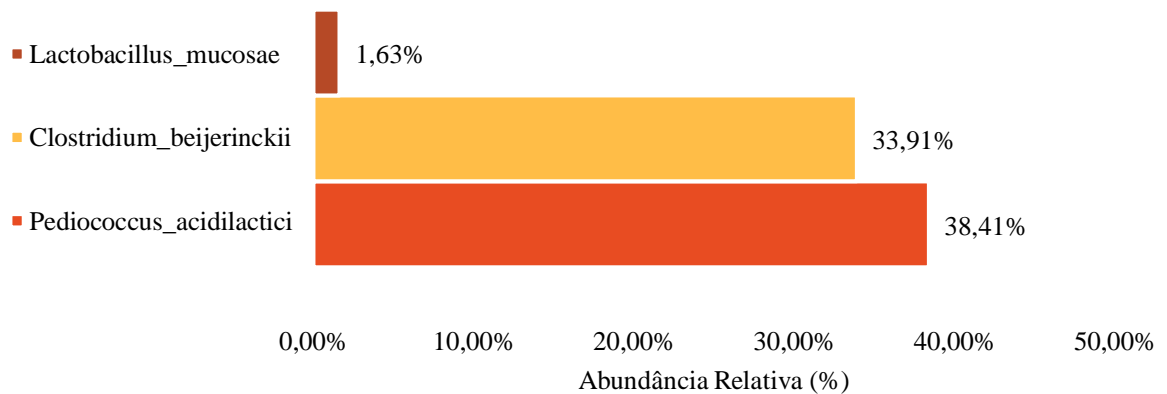
(d)



(e)



f)

AMOSTRA 1**AMOSTRA 2****AMOSTRA 3**

Quanto às avaliações taxonômicas, verificou-se para o filo uma maior diversidade microbiana para a amostra 1 (Figura 5.20 a), conforme já determinado pelo índice Shannon apresentado anteriormente. Como a amostra 1 era *in natura* e não passou previamente por nenhum pré-tratamento, foi constatada a maior diversidade microbiana.

Na amostra 1 foi verificada 7,46 % de abundância relativa de *Euryarchaeota*, pertencente ao Domínio *Arqueia* (Figura 5.20 a). O filo *Euryarchaeota* compreende todas as arqueia metanogênicas, incluindo as acetoclásticas, como *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, além das hidrogenotróficas, como *Methanobacterium*, *Methanoculleus* e *Methanoregula* (KURADE et al., 2020). Além disso, conforme discutido na seção 5.4.2, a relação sintrófica entre as bactérias fermentativas e as arqueias metanogênicas (Figura 5.20 e) foram responsáveis pelas elevadas gerações de CH₄ nos biosistemas fermentativos no 2º estágio, bem como no biosistema em único estágio. Assim, foi possível inferir que bactérias e arqueias estiveram envolvidas na degradação efetiva de substratos e geração de CH₄, respectivamente, como visto nos ensaios anteriores.

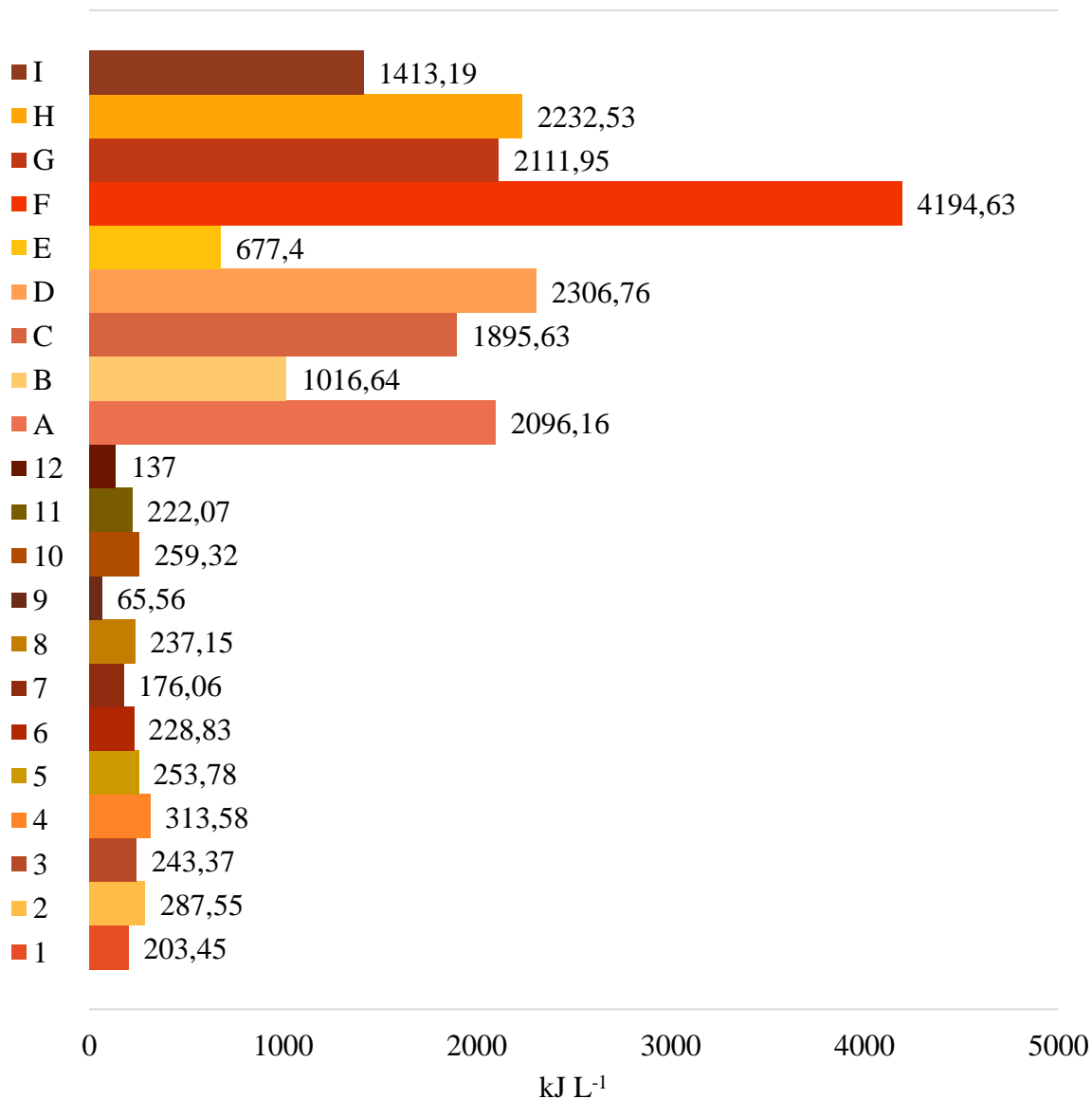
Para a amostra 2, com base na discussão prévia da seção 5.1, a seleção de microrganismos *Bacillus*, *Clostridium* e *Enterobacter* (Figura 5.20 e), por exemplo, dada após o pré-tratamento ácido, foi condizente com a obtenção de H₂ para os testes preliminares (Tabela 5.1), selecionando efetivamente bactérias geradoras de H₂.

Conforme discutido na seção 5.4.3 para a amostra 3, ao final do ensaio de codigestão (ensaio 9), a presença dos resíduos GBR e VC selecionaram os microrganismos *Pediococcus acidilactici* e *Clostridium beijerinckii* (Figura 5.20 f), encontrados em elevada abundância relativa. Assim, a comunidade microbiana sofreu alterações quando comparada ao início do ensaio (amostra 2). Os resíduos em elevadas concentrações selecionaram microrganismos capazes de resistir à essas condições impostas, durante a codigestão, diminuindo ainda mais a diversidade microbiana. Essas bactérias fermentativas presentes na amostra 3 provavelmente foram as responsáveis pela remoção do glicerol bem como da glicose proveniente da VC. *Pediococcus acidilactici*, conforme descrito na seção 5.4.3 e com base na discussão do trabalho de TODOROV; DICKS, (2009), provavelmente foi o microrganismo responsável pela elevada geração de ácido lático ao final do ensaio 9.

5.8 Perspectivas de Recuperação Energética (PRE)

A conversão do biogás produzido em energia representa o potencial alcançado por meio da digestão anaeróbia. As perspectivas energéticas obtidas no presente estudo estão indicadas na Figura 5.21 para todos os ensaios realizados.

Figura 5.21 - Perspectivas de Reuso Energético obtidas no presente estudo.



Assim, os ensaios que apresentaram maior potencial energético foram os ensaios 4, 2, 10 e 5. O ensaio 4 apresentava uma elevada carga orgânica de substratos, GBR e VC, onde, apesar da ausência de H₂ no 1º estágio, foi responsável pela elevada geração de CH₄ no 2º estágio, como discutido nas seções anteriores, aumentando o potencial energético. O ensaio 2 apresentou o benefício duplo de biosistemas integrados, sendo que a geração de H₂ contribuiu para aumento energético.

O ensaio 10, operado numa condição otimizada com o GBRT, apresentou uma elevada capacidade energética dada pelo aumento nas gerações de H₂ e CH₄. Assim como o ensaio 4, o ensaio 5 também foi responsável pela elevada produção de CH₄, acarretando num benefício energético (Figura 5.21).

Para os ensaios com aumento de escala (ensaios A a I), a maior geração de biogás acarretou na elevada obtenção energética. Assim, o ensaio F, que continha 20 g DQO L⁻¹ GBR, 5 g DQO L⁻¹ VC e meio PYG, responsável pela maior produção de biogás (4754,74 mmol L⁻¹), foi o ensaio que apresentou o maior potencial energético (4194,63 kJ L⁻¹). Porém, é possível observar elevada diferença de energia produzida dos ensaios com aumento de escala (A a I) para os ensaios de volume reduzido (ensaios 1 a 12) (Figura 5.21). As diferenças energéticas destes ensaios se deram pelas proporcionalidades distintas de inóculo e *headspace*, que ocasionaram em diferenças significativas na dinâmica e funcionamento dos reatores, implicando diretamente nas gerações de biogás.

Apesar dos ensaios de A a I terem sido montados com base nas concentrações otimizadas de substratos em ensaios prévios (ensaios de 1 a 12), estes não foram montados como uma versão ampliada dos ensaios de 1 a 12, tendo em vista que o reator de escala aumentada precisou se adequar para atingir a eficiência, com um aumento de biomassa e diminuição *headspace*, o que acarretou nas diferenças de biogás gerados quando comparados aos ensaios de 1 a 12.

O Brasil produziu 5,90 milhões de m³ de biodiesel em 2019 (“Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis”, 2020) e 10 % desta produção correspondeu ao glicerol bruto. Dessa forma, estima-se que em 2019 tenham sido gerados cerca de 0,59 milhões de m³ de glicerol bruto. Supondo que esse total de glicerol bruto gerado por ano fosse aplicado em processos para a digestão anaeróbia, como no presente estudo, a fim de serem produzidos H₂ e/ou CH₄, esse biogás poderia ser utilizado para obtenção de energia nas próprias usinas de produção de biodiesel, tornando-se uma indústria autossustentável. Considerando a potência energética alcançada pelo ensaio 4 (313,58 kJ L⁻¹) e pelo ensaio F (4194,63 kJ L⁻¹), seria possível recuperar até 1,85 x 10⁹ MJ e 2,47 x 10¹⁰ MJ, respectivamente, dentro do cenário atual de consumo anual de energia de 1,18 x 10⁸ MJ (RODRIGUES et al., 2020b) de plantas de geração de biodiesel. Sendo assim, toda energia produzida durante a codigestão poderia abastecer completamente a indústria de geração de biodiesel anualmente.

Assim, o presente estudo tornou-se um projeto pioneiro e promissor em termos de aproveitamento de resíduos para geração de H₂ e/ou CH₄. A utilização de diferentes tipos de glicerol bruto advindos de processos de transesterificação para produção de biodiesel

representou um grande desafio devido às altas concentrações de impurezas e contaminantes (metanol e sabão, por exemplo) presentes neste resíduo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioconversão do glicerol bruto em reatores anaeróbios é um grande desafio. A sua elevada carga orgânica, além de contaminantes, como metanol, sabão e ácidos graxos, dificultam os processos biológicos. Entretanto, resultados promissores foram atingidos por meio da codigestão com a vinhaça citrícola, além da adição do esgoto sanitário, que promoveu a facilitação da remoção do glicerol bruto em elevadas concentrações.

A utilização de dois inóculos de fontes distintas permitiu demonstrar a capacidade de remoção, tanto do glicerol bruto quanto da vinhaça citrícola, por processos biológicos. Entretanto, a diferença da composição da comunidade microbiana direcionou as rotas metabólicas para a geração de produtos diferentes.

Para os ensaios dos biosistemas integrados no 1º estágio envolvendo o inóculo I (pré-tratado em trabalhos anteriores com predomínio de *Clostridium* sp.) foi favorecida a rota oxidativa do glicerol durante a codigestão anaeróbia, quando em concentrações reduzidas de glicerol bruto e vinhaça citrícola, gerando H₂ e ácido acético. Entretanto, em elevadas concentrações de ambos os resíduos, a presença de contaminantes do glicerol bruto e da vinhaça citrícola puderam justificar o direcionamento para a rota redutiva, sendo geradas elevadas concentrações de 1,3-PD, onde os equivalentes redutores NADH, gerados durante a fermentação da glicose, foram prontamente utilizados na rota redutiva de fermentação do glicerol. Além disso, expressivas concentrações de glicerol foram removidas durante o processo de codigestão, quando comparado à monodigestão (apenas glicerol bruto adicionado aos reatores controle).

O pré-tratamento ácido no inóculo II favoreceu uma comunidade microbiana rica em bactérias geradoras de H₂, com o predomínio de *Bacillus*. Após a montagem do reator no 1º estágio, a composição da comunidade microbiana, encontrada no inóculo II pré-tratado, foi alterada, com predomínio de microrganismos do gênero *Pediococcus*, o que resultou na elevada geração de ácido lático, ao final de todos os ensaios de codigestão do glicerol bruto com vinhaça citrícola. Para tanto, elevadas remoções de glicerol bruto foram alcançadas para esses referidos ensaios.

Para a fração líquida gerada na finalização do 1º estágio, tanto para os ensaios realizados com o inóculo I quanto com o inóculo II, foi observada a remoção da DQO no 2º estágio. Sendo assim, a matéria orgânica do meio líquido foi transformada à CH₄, indo, portanto, para a fase gasosa. Isso se deveu à presença de arqueias metanogênicas, como *Methanosaeta* e

Methanosarcina, identificadas pelas análises de biologia molecular, presentes no inóculo II *in natura*. Além disso, por se tratar de um consórcio misto, a presença de bactérias como *Aminobacterium*, *Proteiniphilum*, *Syntrophomonas*, *Gelria*, *Fastidiosipila*, *Proteiniclasticum*, *Candidatus_Cloacamonas*, *Macellibacteroides*, *Petrimonas*, *Paenalcaligenes*, *Pseudomonas* e *Lutispora*, puderam remover ácidos graxos, aminoácidos, açúcares e outros compostos orgânicos presentes nesses ensaios, atuando numa relação sintrófica, fornecendo ácido acético e H₂ para as arqueias metanogênicas, resultando na elevada geração de gás metano no 2º estágio. O inóculo II *in natura* foi capaz de remover completamente o metanol presente no glicerol bruto.

A utilização do inóculo I na presença de glicerol bruto pré-tratado resultou na maior geração de H₂. Os ensaios envolvendo este resíduo sem pré-tratamento comprovaram o efeito retardante do sabão (contaminante presente no glicerol bruto) na atividade microbiológica para a geração de H₂. Vale ressaltar que mesmo os ensaios contendo o glicerol bruto com impurezas, foi possível atingir elevadas eficiências de remoção de glicerol, quando codigerido com a vinhaça citrícola.

Os biosistemas em escala ampliada resultaram em elevadas gerações de CH₄ na presença do inóculo II *in natura*. Este consórcio apresentou mecanismos adaptativos em decorrência da adição gradual de glicerol bruto ao reator, sendo removidas elevadas concentrações de glicerol bruto e vinhaça citrícola, reduzindo os valores de DQO. Além disso, este inóculo foi capaz de consumir o metanol em todas as condições testadas, apresentando resultados promissores para a degradação deste composto.

O presente trabalho, inédito na área de reaproveitamento de resíduos e geração de bioenergia, gerou resultados promissores. O objetivo deste estudo foi atingido com eficiência na remoção do glicerol, proveniente da produção de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos, bem como do seu principal contaminante, o metanol. Além disso, cabe enaltecer a geração concomitante de produtos de valor agregado como o 1,3-PD, ácido propiônico e ácido láctico, além de biogás como H₂ e CH₄. Assim, a energia gerada durante a codigestão anaeróbia poderá perfeitamente abastecer as indústrias geradoras destes resíduos, tornando a produção de biodiesel e vinhaça citrícola sustentável, equilibrando produção e gestão de resíduos.

7 CONCLUSÕES

- Os inóculos I e II, provenientes de fontes distintas, foram capazes de remover tanto o glicerol bruto quanto a vinhaça citrícola. O direcionamento das rotas metabólicas para a produção dos metabólitos secundários e geração de biogás foi dado pela composição da comunidade microbiana que sofreu alterações com base nos processos ao qual foi submetida, como o ataque ácido e a codigestão com os resíduos.

- Inóculo I no 1º estágio (fermentação):
 - Favorecimento da rota oxidativa do glicerol quando em concentrações reduzidas de GBR e VC, levando à geração de elevadas concentrações de H₂ e ácido acético.
 - Favorecimento da rota redutiva do glicerol quando em elevadas concentrações de ambos os resíduos, sendo facilitada pela codigestão glicerol/glicose, levando à geração de elevadas concentrações de 1,3-PD.
 - Codigestão glicerol/glicose foi superior à monodigestão (controle contendo somente glicerol bruto) em relação à remoção de glicerol e geração de metabólitos secundários.

- Inóculo II no 1º estágio (fermentação):
 - Pré-tratamento ácido no inóculo II: favorecimento de *Bacillus* (bactérias geradoras de H₂), inóculo esse pré-tratado utilizado para a montagem dos ensaios de codigestão.
 - Após a operação dos reatores: predomínio de microrganismos *Pediococcus*, sendo identificadas as maiores gerações de ácido láctico para todos os ensaios realizadas com o inóculo II. Assim, o consórcio microbiano sofreu alterações na comunidade microbiana dada pela presença dos resíduos GBR e VC.
 - Elevadas remoções de GBR e VC, sendo favorecidas pela codigestão glicerol/glicose.

- Frações líquidas provenientes do 1º estágio dos ensaios com os inóculos I e II:
 - Elevadas remoções de matéria orgânica.
 - Elevadas gerações de CH₄ na codigestão glicerol/glicose.
 - Relações sintróficas entre bactérias e arqueias metanogênicas.
 - Remoção completa do metanol.

- Inóculo I foi responsável pela maior geração de H_2 dada pela presença de *Clostridium* nos ensaios. Assim, na operação de reatores em condições otimizadas:
 - GBRT (glicerol bruto pré-tratado) apresentou elevada geração de H_2 , sendo verificado o efeito retardante do sabão contido no glicerol bruto.
 - Elevadas remoções de matéria orgânica nas codigestões glicerol/glicose e glicerol/glicose/esgoto sanitário.

- Biosistemas em reator de escala aumentada:
 - Elevadas gerações de CH_4 .
 - Mecanismos adaptativos decorrente da adição gradual de GBR.
 - Elevadas remoções de GBR e VC nas codigestões glicerol/glicose e glicerol/glicose/esgoto sanitário.
 - Remoção completa do metanol.

8 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO PRESENTE ESTUDO

Este estudo explorou as concentrações ideais dos substratos (glicerol bruto e vinhaça citrícola) em reatores anaeróbios em batelada para biosistemas integrados a fim de serem removidos o glicerol e a vinhaça citrícola, gerando biogás e produtos de valor agregado. Após essa etapa, a execução de ensaios em reator em escala aumentada para a geração de CH₄ apresentou potencial energético elevado.

Sendo assim, como sugestões para a continuidade do presente estudo seriam buscar e aplicar estratégias para a separação efetiva dos produtos de valor agregado gerados no meio líquido dos processos fermentativos, tendo em vista a recuperação de ácido láctico, ácido propiônico, 1,3-propanodiol e outros metabólitos de valor agregado como o etanol, butanol e acetona que possam ter sido gerados em concentrações significativas. As separações dos metabólitos podem ser feitas mediante várias técnicas como pervaporação (permeação através de membranas); o uso de diferentes líquidos iônicos hidrofóbicos; extração reativa; extração líquido-líquido; evaporação; destilação, além da cromatografia de troca iônica. Métodos esses a serem estudados e escolhidos a fim de tornar economicamente viável a recuperação dos metabólitos, podendo ser alcançados avanços ainda mais importantes para a bioconversão microbiana do glicerol bruto e vinhaça citrícola, agregando valor a estes resíduos.

Além disso, a implementação de reatores anaeróbios de codigestão em escala piloto nas próprias usinas geradoras destes resíduos, proporcionariam a aplicabilidade em situação real de todo estudo realizado nesta tese, garantindo a remoção tanto de glicerol bruto quanto de vinhaça citrícola, onde o biogás gerado (CH₄) pudesse abastecer energeticamente as indústrias em questão.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A. Z.; YAACOB, M. H.; BASIR, N. I. Synergy between oxides of Ni and Ca for selective catalytic lactic acid synthesis from glycerol in a single step process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 85, p. 282–288, 2020.

ABIOVE. **Arquivo com Estatística Mensal. Estatística Mensal do Complexo Soja.**
 ABIOVE. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS.**
Arquivos com estatísticas do biodiesel. Biodiesel: produção por tipo de matéria-prima.
 Disponível em:

<<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em:

<<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

ALGAPANI, D. E. et al. Long-term bio-H₂ and bio-CH₄ production from food waste in a continuous two-stage system: Energy efficiency and conversion pathways. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 204–213, 2018.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Water Environment Federation**, v. Centennia, n. 21th ed. American Water Works Association, 2005.

AMIN, F. R. et al. Functions of bacteria and archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. **Science of the Total Environment**, n. xxxx, p. 143007, 2020.

ANP. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

ANP. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/canais_atendimento/imprensa/noticias-comunicados/mistura-de-biodiesel-ao-diesel-passa-a-ser-de-13-a-partir-de-hoje-1-3>. Acesso em: 2 mar. 2021.

ANWAR, M. Biodiesel feedstocks selection strategies based on economic, technical, and sustainable aspects. **Fuel**, v. 283, p. 119204, 2021.

APIWATANAPIWAT, W. et al. Xylan supplement improves 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 6, p. 662–668, 2018.

APROBIO. Disponível em: <<https://aprobio.com.br/2017/01/10/brasil-recicla-30-milhoes-de-litros-de-oleo-de-cozinha-na-producao-de-biodiesel/>>.

AQUINO, S. F. et al. Metodologias para a Determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.

ASTALS, S.; NOLLA-ARDÈVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J. Thermophilic co-digestion of pig manure and crude glycerol: Process performance and digestate stability. **Journal of**

Biotechnology, v. 166, n. 3, p. 97–104, 2013.

ATHAR, M.; ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalysts, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, p. 104523, 2020.

AWAN, A. T.; TSUKAMOTO, J.; TASIC, L. Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. **RSC Advances**, v. 3, p. 25071–25078, 2013.

BABA, Y. et al. Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 342–348, 2013.

BADIA-FABREGAT, M. et al. Hydrogen production from crude glycerol in an alkaline microbial electrolysis cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17204–17213, 2019.

BALDI, F.; PECORINI, I.; IANNELLI, R. Comparison of single-stage and two-stage anaerobic co-digestion of food waste and activated sludge for hydrogen and methane production. **Renewable Energy**, v. 143, p. 1755–1765, 2019.

BARRETO, J. C. G.; TITA, D. L.; ORLANDI, M. O. DEVELOPMENT OF AN AUTOMATED METHOD TO PERFORM A QUANTITATIVE STUDY OF PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND THE EFFECT OF A CONDUCTIVE LAYER IN SCANNING ELECTRON MICROSCOPY. **Química Nova**, v. 42, n. 4, p. 447–452, 2019.

BASKARAN, S. M. et al. Valorization of biodiesel side stream waste glycerol for rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* RS6. **Environmental Pollution**, v. 276, p. 116742, 2021.

BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R.; BOLDRIN, M. V. Food Chemistry Electrosynthesis of three-dimensional nanoporous nickel on screen-printed electrode used for the determination of narirutin in citrus wastewater. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129427, 2021.

BERNAT, K. et al. Leachate after aerobic stabilization of municipal solid waste supplemented by waste glycerine from saponification to improve biogas production during co-digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, 2021.

BONDIOLI, P.; BELLA, L. DELLA. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 107, p. 153–157, 2005.

CAI, G. et al. Variation of volatile fatty acid oxidation and methane production during the bioaugmentation of anaerobic digestion system: Microbial community analysis revealing the influence of microbial interactions on metabolic pathways. **Science of the Total Environment**, v. 754, p. 142425, 2021.

CEMPRE. **CEMPRE - Compromisso Empresarial para Reciclagem. Preço dos Materiais**

Recicláveis. Disponível em: <<http://cempre.org.br/cempre-informa/id/105/preco-dos-materiais-reciclaveis>>. Acesso em: 7 mar. 2019.

CÉSAR, A. DA S. et al. The potential of waste cooking oil as supply for the Brazilian biodiesel chain. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 246–253, 2017.

CÉSAR, A. DA S. et al. Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil. **Renewable Energy**, v. 133, p. 1147–1157, 2019.

CHEN, H. et al. Biohythane production and microbial characteristics of two alternating mesophilic and thermophilic two-stage anaerobic co-digesters fed with rice straw and pig manure. **Bioresource Technology**, v. 320, n. PA, p. 124303, 2021a.

CHEN, M. et al. Illumina MiSeq sequencing reveals microbial community succession in salted peppers with different salinity during preservation. **Food Research International**, v. 143, n. March, p. 110234, 2021b.

CHI, Z. et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537–1545, 2007.

CNPE. Diário Oficial da União. **República Federativa do Brasil**, p. 7042, 2021.

CREMONEZ, P. A. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. 2015, p. 415–428, 2015.

DE GIOANNIS, G. et al. Energy recovery from one- and two-stage anaerobic digestion of food waste. **Waste Management**, v. 68, p. 595–602, 2017.

DHAWANE, S. H. et al. Parametric optimisation of biodiesel synthesis from waste cooking oil via Taguchi approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 3971–3980, 2018.

DIYA’UDDEEN, B. H. et al. Performance evaluation of biodiesel from used domestic waste oils: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, n. 3, p. 164–179, 2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.

DUTRA, R. C. D.; CARPIO, L. G. T. Biodiesel auctions in Brazil: Symmetry of bids and informational paradigm. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 137, n. September 2020, p. 110418, 2021.

EDER, A. S. et al. Comparison of hydrogen and volatile fatty acid production by *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter aerogenes* singly, in co-cultures or in the bioaugmentation of microbial consortium from sugarcane vinasse. **Environmental Technology and Innovation**, v. 18, p. 100638, 2020.

ELGHARBAWY, A. S. et al. Maximizing biodiesel production from high free fatty acids

- feedstocks through glycerolysis treatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 146, p. 105997, 2021.
- FAN, L. et al. Thermosonication pretreatment enhances the killing of germinated *Bacillus* spores adhered to stainless steel surface. **Lwt**, v. 136, n. P1, p. 110248, 2021.
- FOKUM, E. et al. Co-fermentation of glycerol and sugars by *Clostridium beijerinckii* : Enhancing the biosynthesis of 1,3-propanediol. **Food Bioscience**, v. 41, n. 301, p. 101028, 2021.
- FU, S.-F. et al. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.
- GAUR, A. et al. A review on factor affecting biodiesel production from waste cooking oil: An Indian perspective. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2020.
- GOMES, B. C. et al. Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8650–8660, 2015.
- GOV.BR. **Selo Combustível Social**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/biodiesel/selo-combustivel-social>>.
- GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.
- GUABIROBA, R. C. DA S. et al. Value chain analysis of waste cooking oil for biodiesel production : Study case of one oil collection company in Rio de Janeiro - Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 3928–3937, 2017.
- GUO, N. et al. Mechanisms of metabolic performance enhancement during electrically assisted anaerobic treatment of chloramphenicol wastewater. **Water Research**, v. 156, p. 199–207, 2019.
- GUPTA, A. R.; YADAV, S. V; RATHOD, V. K. Enhancement in biodiesel production using waste cooking oil and calcium diglyceroxide as a heterogeneous catalyst in presence of ultrasound. **FUEL**, v. 158, p. 800–806, 2015.
- HASHEMI, S. M. B.; ROOHI, R. Kinetic models for production of propionic acid by *Propionibacter freudenreichii* subsp. *shermanii* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in date syrup during sonication treatments. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. January, p. 613–619, 2019.
- HEJNA, A. et al. Potential applications of crude glycerol in polymer technology – Current state and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 449–475, 2016.
- HOANG, L. et al. First investigation of microbial diversity and biogenic methane potential in coal mines located in the Red River Basin , Vietnam. **International Journal of Coal Geology**, p. 103674, 2021.

IANDA, T. F.; PADULA, A. D. Exploring the Brazilian experience to design and simulate the impacts of a biodiesel program for sub-Saharan countries : The case of Guinea-Bissau. **Energy Strategy Reviews**, v. 32, p. 100547, 2020.

ICHINOSE, R. et al. Suppression of lactate production of *Lactobacillus reuteri* JCM1112 by co-feeding glycerol with glucose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 1, p. 110–115, 2020.

JIN, E. S.; LEE, M. H.; MALLOY, C. R. The presence of 3-hydroxypropionate and 1, 3-propanediol suggests an alternative path for conversion of glycerol to Acetyl-CoA. **Metabolism Open**, v. 9, p. 100086, 2021.

JUN, S.-A. et al. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 491–501, 2010.

KALNENIECE, K. et al. Effect of hydrogen peroxide on the dehydrogenase and quinone-reductase activity of irradiated *Lactobacillus plantarum* cells. **Lwt**, v. 134, n. August, p. 110236, 2020.

KANCHANASUTA, S.; SILLAPARASSAMEE, O. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 3440–3446, 2017.

KNOLL, C.; DIVOL, B.; DU TOIT, M. Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 983–991, 2008.

KONGJAN, P. et al. Co-fermentation of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol from crude glycerol derived from the biodiesel production process by newly isolated *Enterobacter* sp.: Optimization factors affecting. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100616, 2021.

KUMAR, L. R. et al. Identifying economical route for crude glycerol valorization: Biodiesel versus polyhydroxy-butyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124565, 2021.

KUPILA, R. et al. Lignin-based activated carbon-supported metal oxide catalysts in lactic acid production from glucose. **Applied Catalysis A: General**, v. 612, p. 118011, 2021.

KURADE, M. B. et al. Acetoclastic methanogenesis led by *Methanosarcina* in anaerobic co-digestion of fats, oil and grease for enhanced production of methane. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 351–359, 2019.

KURADE, M. B. et al. Microbial community acclimatization for enhancement in the methane productivity of anaerobic co-digestion of fats, oil, and grease. **Bioresource Technology**, v. 296, p. 122294, 2020.

KURAHASHI, K. et al. Value-adding conversion and volume reduction of sewage sludge by anaerobic co-digestion with crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 119–125,

2017.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Developments of Bacterial Population and Methanogenic Activity in a Laboratory-Scale Landfill Bioreactor. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3673–3679, 1998.

LEI, Z. et al. Characterization of microbial evolution in high-solids methanogenic co-digestion of canned coffee processing wastewater and waste activated sludge by an anaerobic membrane bioreactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 232, p. 1442–1451, 2019.

LERTSRIWONG, S.; GLINWONG, C. Newly-isolated hydrogen-producing bacteria and biohydrogen production by *Bacillus coagulans* MO11 and *Clostridium beijerinckii* CN on molasses and agricultural wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 51, p. 26812–26821, 2020.

LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, n. 37, p. 1–39, 2007.

LI, Y. et al. Enhancing anaerobic degradation of phenol to methane via solubilizing Fe(III) oxides for dissimilatory iron reduction with organic chelates. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121858, 2019.

LIAO, Q. et al. How can hydrothermal treatment impact the performance of continuous two-stage fermentation for hydrogen and methane co-generation? **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2020.

LIN, L. et al. Deep insights into fungal diversity in traditional Chinese sour soup by Illumina MiSeq sequencing. **Food Research International**, v. 137, p. 109439, 2020.

LIU, H. et al. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 24, p. 9696–9701, 2009.

LIU, H. et al. Omics-based analyses revealed metabolic responses of *Clostridium acetobutylicum* to lignocellulose-derived inhibitors furfural, formic acid and phenol stress for butanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2019.

LOVATO, G. et al. Energetic feasibility of a two-stage anaerobic digestion system compared to a single-stage system treating whey and glycerin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107653, 2020.

MA, J. et al. Powdered activated carbon facilitates methane productivity of anaerobic co-digestion via acidification alleviating: Microbial and metabolic insights. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 123706, 2020.

MAHATO, N. et al. Bio-sorbents, industrially important chemicals and novel materials from citrus processing waste as a sustainable and renewable bioresource: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p. 61–82, 2020.

MAINA, S. et al. Evaluation of 1,3-propanediol production by two *Citrobacter freundii* strains using crude glycerol and soybean cake hydrolysate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 35, p. 35523–35532, 2019.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309–4317, 2008.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 13508–13517, 2011.

MARAGKAKI, A. E. et al. Pilot-scale anaerobic co-digestion of sewage sludge with agro-industrial by-products for increased biogas production of existing digesters at wastewater treatment plants. **Waste Management**, v. 59, p. 362–370, 2017.

MASPOLIM, Y. et al. Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems - Performance and microbial community dynamics. **Chemosphere**, v. 140, p. 54–62, 2015.

MEIER, T. R. W. et al. Production of biohydrogen by an anaerobic digestion process using the residual glycerol from biodiesel production as additive to cassava wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, 2020.

METSOVITI, M. et al. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 4, p. 408–418, 2013.

MIRANDA, A. C. et al. Analysis of the costs and logistics of biodiesel production from used cooking oil in the metropolitan region of Campinas (Brazil). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, p. 373–379, 2018.

MOHAMMADI, P. et al. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, p. 1654–1658, 2011.

MONLAU, F. et al. Alkaline pretreatment to enhance one-stage CH₄ and two-stage H₂/CH₄ production from sunflower stalks: Mass, energy and economical balances. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 377–385, 2015.

MONTOYA, A. C. V. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas da produção de hidrogênio e homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de café.** [s.l: s.n.].

MUNFORD, A. R. G.; CHAVES, R. D.; SANT'ANA, A. S. Inactivation kinetics of beer spoilage bacteria (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, and *Pediococcus damnosus*) during acid washing of brewing yeast. **Food Microbiology**, v. 91, n. December 2019, p. 103513, 2020.

MURTA, A. L. S. et al. The use of palm oil biodiesel blends in locomotives: An economic, social and environmental analysis. **Renewable Energy**, v. 164, p. 521–530, 2021.

NARTKER, S. et al. Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. **Waste Management**, v. 34, n. 12, p. 2567–2571, 2014.

NATHAO, C. Biological hydrogen and methane production from food waste two stage. **King Mongkut's University of Technology North Bangkok**, p. 147, 2012.

NESPECA, M. G. et al. Determination of alcohols and volatile organic acids in anaerobic bioreactors for H₂ production by near infrared spectroscopy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 32, p. 20480–20493, 2017.

NGUYEN, P. D. et al. Long-term operation of the pilot scale two-stage anaerobic digestion of municipal biowaste in Ho Chi Minh City. **Science of the Total Environment**, v. 766, p. 142562, 2021.

OH, B.-R. et al. The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 719–724, 2013.

OH, S.-E.; GINKEL, S. VAN; LOGAN, B. E. The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. **Environmental Science Technology**, v. 37, n. 22, p. 5186–5190, 2003.

OLIVEIRA, F. C. DE; COELHO, S. T. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, n. October 2016, p. 168–179, 2017.

PACHIEGA, R. et al. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 155–163, 2019a.

PACHIEGA, R. et al. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2019b.

PACHIEGA, R. **Produção biológica de gás hidrogênio a partir de concentrações crescentes de resíduos citrícolas em reatores anaeróbios em batelada sob condições mesofílicas**. [s.l.] UNESP, 2019.

PALUD, A. et al. New genes involved in mild stress response identified by transposon mutagenesis in *Lactobacillus paracasei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–14, 2018.

PARANHOS, A. G. DE O.; SILVA, E. L. Statistical optimization of H₂, 1,3-propanediol and propionic acid production from crude glycerol using an anaerobic fluidized bed reactor: Interaction effects of substrate concentration and hydraulic retention time. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, p. 105575, 2020.

PASTERIS, S. E.; DE SAAD, A. M. S. Transport of glycerol by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine. **Food Microbiology**, v. 25, p. 545–549, 2008.

PINTO, M. G. V.; PASTERIS, S. E.; SAAD, A. M. S. DE. Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. **Food Microbiology**, v. 21, p. 111–118, 2004.

PRASERTSAN, P. et al. Enhanced biogas production by co-digestion of crude glycerol and ethanol with palm oil mill effluent and microbial community analysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 148, p. 106037, 2021.

RATTI, R. P. et al. Bacterial communities in thermophilic H₂-producing reactors investigated using 16S rRNA 454 pyrosequencing. **Microbiological Research**, v. 173, p. 10–17, 2015.

RAZAVIARANI, V.; BUCHANAN, I. D. Bioresource Technology Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge : Microbial community structure dynamics and reactor performance. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 182, p. 8–17, 2015.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual: bactérias e fungos**. [s.l: s.n.].

RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 6, p. 2481–2488, 2014.

RODRIGUES, C. V. et al. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 33, p. 14641–14651, 2016.

RODRIGUES, C. V. **Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel**. [s.l: s.n.].

RODRIGUES, C. V. et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, n. 1, p. 144–154, 2019a.

RODRIGUES, C. V. et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2019b.

RODRIGUES, C. V. et al. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 21, p. 11943–11953, 2020a.

RODRIGUES, C. V. et al. Biohydrogen production in an integrated biosystem using crude glycerol from waste cooking oils. **Renewable Energy**, v. 162, p. 701–711, 2020b.

RODRIGUES, F. **Abiove a favor do uso de mais biodiesel nos ônibus de São Paulo**. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/meioambiente/cidade/abiove-favor-uso-mais-biodiesel-onibus-sao-paulo-220917>>.

RODRIGUES, F. **Óleo reciclado representou 12,5% do biodiesel fabricado pela JBS em**

2018. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/info/oleo-reciclado-representou-12-5-do-biodiesel-fabricado-pela-jbs-em-2018-210219>>.

RODRIGUES, C. V et al. Biohydrogen generation: Concepts and applications on brazilian agro-industrial wastewaters. In: **Biohydrogen: Production, Applications and Technology**. [s.l: s.n.]. p. 1–68.

ROSSI, D. M. et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. 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.

Sabesp. Disponível em:

<http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_completo.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2019.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 891–898, 2014.

SARMA, S.; DUBEY, V. K.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and thermodynamic analysis (with statistical optimization) of hydrogen production from crude glycerol using *Clostridium pasteurianum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 44, p. 19972–19989, 2016.

SARMA, S. J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, 2012.

SARMA, S. J. et al. Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion : a techno-economic evaluation. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 36, p. 1–10, 2013.

SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2019a.

SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 56, p. 29575–29582, 2019b.

SAXENA, R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol : Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 895–913, 2009.

SEDLAR, K. et al. Phenotypic and genomic analysis of isopropanol and 1,3-propanediol producer *Clostridium diolis* DSM 15410. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 1109–1119, 2021.

SEEKAO, N. et al. Co-digestion of palm oil mill effluent with chicken manure and crude glycerol: biochemical methane potential by monod kinetics. **Heliyon**, v. 7, n. 2, p. e06204, 2021.

SELEMBO, P. A. et al. Enhanced Hydrogen and 1,3-Propanediol Production From Glycerol by Fermentation Using Mixed Cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098–1106, 2009.

SETA, K. et al. Potential use of methane fermentation digested slurry as a low-cost, environmentally-friendly nutrient for bioethanol production from crude glycerol by *Klebsiella variicola* TB-83D. **New BIOTECHNOLOGY**, v. 44, n. February, p. 1–5, 2018.

SHARMA, K. et al. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29–46, 2017.

SHEN, R. et al. Simultaneous carbon dioxide reduction and enhancement of methane production in biogas via anaerobic digestion of cornstalk in continuous stirred-tank reactors: The influences of biochar, environmental parameters, and microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 319, n. 12, p. 124146, 2021.

SI, B. et al. The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 35, p. 11414–11421, 2015.

SILVA-ILLANES, F. et al. Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. **Energy**, v. 141, p. 358–367, 2017.

SILVA, F. M. S. et al. Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22720–22729, 2017.

SILVA, F. M. S. et al. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339–349, 2018.

SIMÕES, A. N. **Processamento do glicerol bruto em reatores anaeróbios de leite fluidificado, acidogênico e metanogênico em temperatura mesofílica.** [s.l.: s.n.].

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, v. 80, p. 109–116, 2015.

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.

SONG, Z.-X. et al. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 7, p. 5631–5636, 2012.

SUN, Y. Q. et al. Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. **Process Biochemistry**, n. April, p. 0–1, 2018.

SUNYOTO, N. M. S. et al. Effect of biochar addition on hydrogen and methane production in two-phase anaerobic digestion of aqueous carbohydrates food waste. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 29–36, 2016.

TANGKATHITIPONG, P. et al. Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Renewable Energy**, v. 113, p. 1077–1085, 2017.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2–3, p. 117–126, 2009.

TOPARE, N. S.; PATIL, K. D. Biodiesel from waste cooking soybean oil under ultrasonication as an alternative fuel for diesel engine. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, p. 1–4, 2021.

TOPARE, N. S.; PATIL, K. D.; KHEDKAR, S. V. Effects of operating parameters on biodiesel production from waste cooking oil under ultrasonic irradiation. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, p. 1–4, 2021.

TORQUATO, L. D. M. et al. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. **Waste Management**, v. 59, p. 181–193, 2017.

VASIEE, A. et al. Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 5, p. 471–479, 2020.

VERAS, S. T. S. et al. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, 2019.

VIEIRA, B.; NADALETI, W. C.; SARTO, E. The effect of the addition of castor oil to residual soybean oil to obtain biodiesel in Brazil: Energy matrix diversification. **Renewable Energy**, v. 165, p. 657–667, 2021.

VIVEK, N. et al. Self-cycling fermentation for 1,3-propanediol production: Comparative evaluation of metabolite flux in cell recycling, simple batch and continuous processes using *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3 strain. **Journal of Biotechnology**, v. 259, p. 110–119, 2017.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 222–230, 2016.

WANG, F. et al. Anaerobic co-digestion of corn stover and wastewater from hydrothermal carbonation. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123788, 2020a.

WANG, J.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 12, p. 2934–2941, 2008.

WANG, J.; YIN, Y. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4804–4823, 2017.

WANG, P. et al. Functional characteristic of microbial communities in large-scale biotreatment systems of food waste. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141086, 2020b.

WANG, W. et al. Reprogramming the metabolism of *Klebsiella pneumoniae* for efficient 1,3-propanediol production. **Chemical Engineering Science**, v. 236, p. 116539, 2021a.

WANG, Y. et al. Efficiency enhancement of H₂ production by a newly isolated maltose-preferring fermentative bio-hydrogen producer of *Clostridium butyricum* NH-02. **Journal of Energy Storage**, v. 30, p. 101426, 2020c.

WANG, Z. et al. Enhancing energy recovery via two stage co-fermentation of hydrothermal liquefaction aqueous phase and crude glycerol. **Energy Conversion and Management**, v. 231, p. 113855, 2021b.

WANG, Z.; YANG, S. T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 116–123, 2013.

WILKENS, E. et al. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1057–1063, 2012.

WISCHRAL, D. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016.

XAFENIAS, N.; ANUNOBI, M. S. O.; MAPELLI, V. Electrochemical startup increases 1,3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1499–1508, 2015.

XIN, B. et al. Co-utilization of glycerol and lignocellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium diolis*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

XIU, Z. et al. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol – glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42–52, 2007.

YAN, W. et al. In-situ alkaline enhanced two-stage anaerobic digestion system for waste cooking oil and sewage sludge co-digestion. **Waste Management**, v. 120, p. 221–229, 2021.

YANG, G.; WANG, J. Kinetics and microbial community analysis for hydrogen production using raw grass inoculated with different pretreated mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 954–962, 2018.

YANG, G.; WANG, J.; SHEN, Y. Antibiotic fermentation residue for biohydrogen

production using different pretreated cultures: Performance evaluation and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 122012, 2019.

YANG, X. et al. Improved production of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, n. April, p. 25–36, 2018.

YIN, Q. et al. Enhancing electron transfer by ferroferric oxide during the anaerobic treatment of synthetic wastewater with mixed organic carbon. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 119, p. 104–110, 2017.

YIN, Q. et al. Clarifying electron transfer and metagenomic analysis of microbial community in the methane production process with the addition of ferroferric oxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 333, p. 216–225, 2018.

YUN, J. et al. Co-fermentation of glycerol and glucose by a co-culture system of engineered *Escherichia coli* strains for 1,3-propanediol production without vitamin B12 supplementation. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124218, 2021.

ZAVARIZE, D. G.; BRAUN, H.; DE OLIVEIRA, J. D. Methanolysis of low-FFA waste cooking oil with novel carbon-based heterogeneous acid catalyst derived from Amazon açai berry seeds. **Renewable Energy**, v. 171, p. 621–634, 2021.

ZEB, I. et al. Kinetic and microbial analysis of methane production from dairy wastewater anaerobic digester under ammonia and salinity stresses. **Journal of Cleaner Production**, v. 219, p. 797–808, 2019.

ZHANG, A. et al. Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 374–381, 2015.

ZHAO, H. et al. Coproduction of hydrogen and lactic acid from glucose photocatalysis on band-engineered Zn_{1-x}Cd_xS homojunction. **iScience**, v. 24, n. 2, p. 102109, 2021.

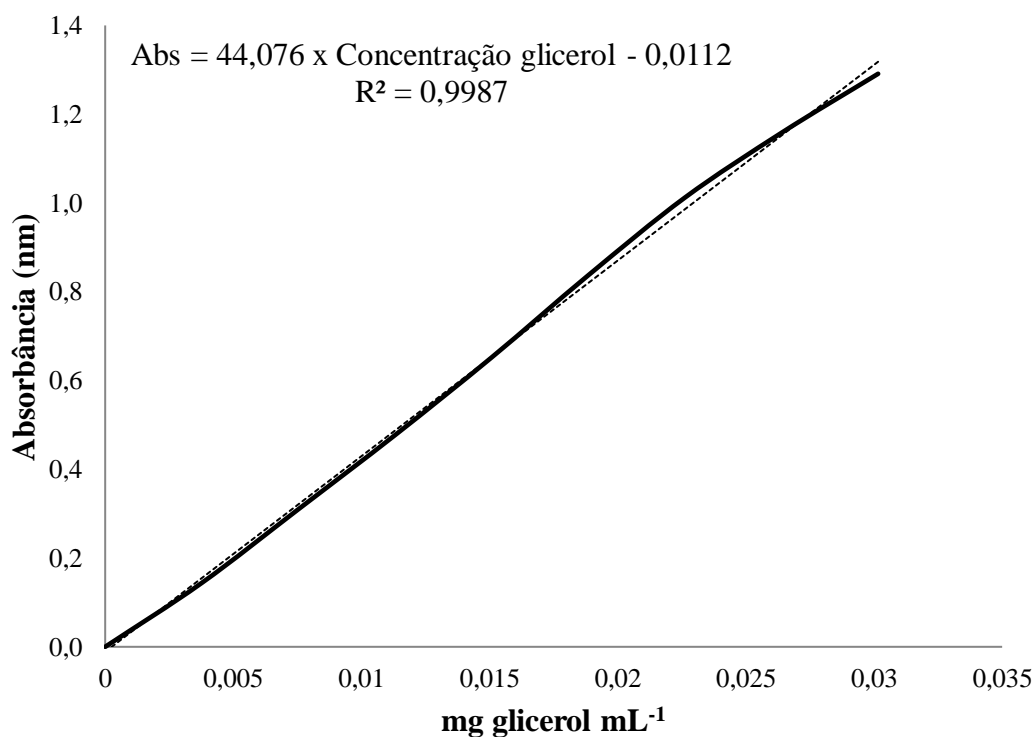
ZHU, Q. et al. Enrichment of waste sewage sludge for enhancing methane production from cellulose. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124497, 2021.

ANEXO A – Determinação de glicerol pelo método físico-químico para os ensaios fermentativos de 1 a 5, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos.

Tabela A.1 – Medidas de absorvância e concentração (mg mL^{-1}) para a análise da curva de calibração de glicerol, realizados em duplicata.

$\text{mg glicerol mL}^{-1}$	Média Absorvância (nm)
0	0
0,00377	0,144
0,00754	0,31
0,01131	0,477
0,01508	0,652
0,01885	0,837
0,02262	1,012
0,02639	1,158
0,03016	1,291

Figura A.1 – Obtenção da curva de calibração para a determinação de glicerol.

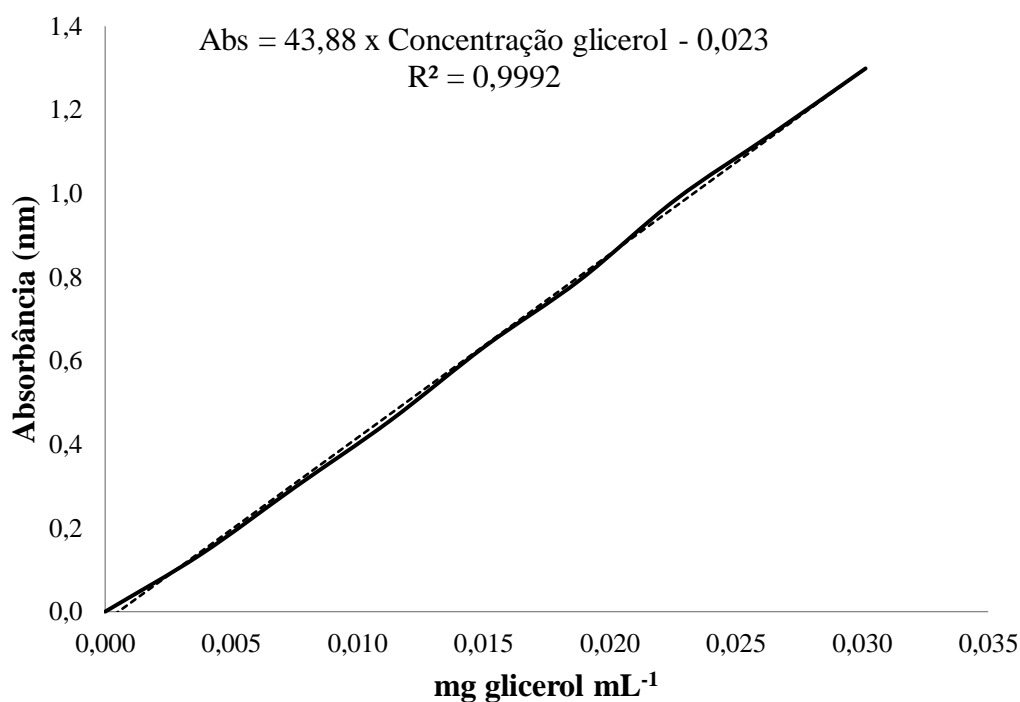


ANEXO B – Determinação de glicerol pelo método físico-químico para os ensaios fermentativos de 6 a 9, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos.

Tabela B.1 – Medidas de absorvância e concentração (mg mL^{-1}) para a análise da curva de calibração de glicerol, realizados em duplicata.

$\text{mg glicerol mL}^{-1}$	Média Absorvância (nm)
0,000	0,000
0,004	0,136
0,008	0,298
0,011	0,457
0,015	0,635
0,019	0,794
0,023	0,985
0,026	1,140
0,030	1,299

Figura B.1 – Obtenção da curva de calibração para a determinação de glicerol.



ANEXO C – Determinação de glicerol e 1,3-PD pelo método cromatográfico para os ensaios fermentativos de 10 a 12, bem como seus respectivos controles e ensaios metanogênicos, além dos ensaios de A e I.

Tabela C.1 Glicerol e 1,3-PD identificados e quantificados por GC-MS por injeção de líquido. Tempo de retenção (T_R), massa molar (MM), temperatura de ebulição (T_b) e razão m/z do íon alvo para quantificação (Q_t).

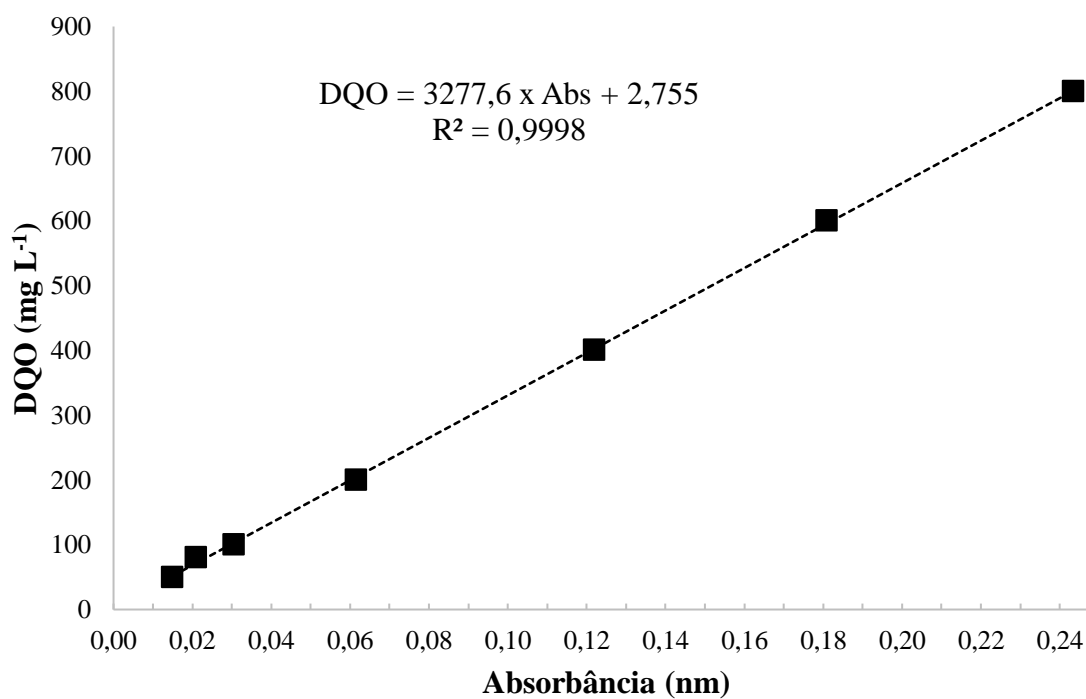
Compostos	T_R (min)	MM (g mol^{-1})	T_b ($^{\circ}\text{C}$)	Q_t (m/z)
1,3-PD	1,985	76,09	213	28
Glicerol	4,27	92,09	290	61

ANEXO D – Obtenção da curva de calibração para DQO.

Tabela D.1 – Medidas de absorvância e concentração (mg L^{-1}) para a análise da curva de calibração de DQO, realizadas em duplicata.

DQO (mg L^{-1})	Média Absorvância (nm)
50	0,015
80	0,021
100	0,031
200	0,062
400	0,122
600	0,181
800	0,244

Figura D.1 – Obtenção da curva de calibração de DQO.

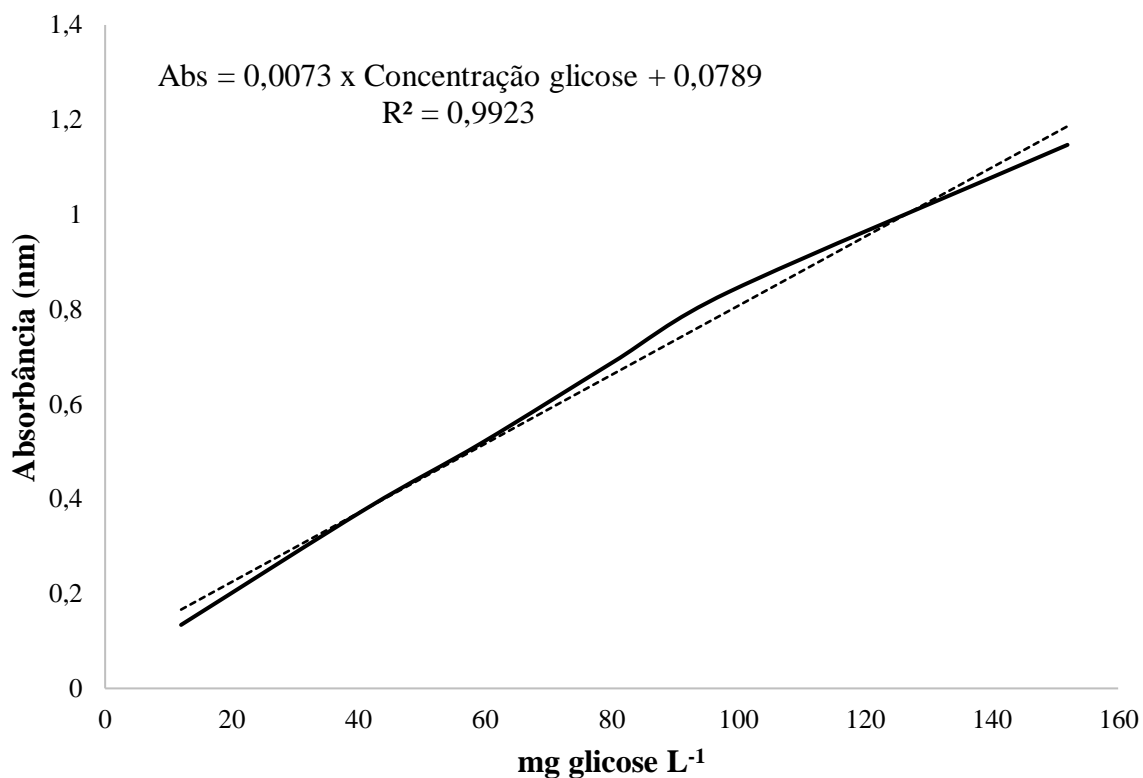


ANEXO E – Obtenção da curva de calibração para carboidratos totais – glicose.

Tabela E.1 – Medidas de absorvância e concentração (mg L^{-1}) para a análise da curva de calibração de carboidratos totais, realizados em duplicata.

mg L^{-1}	Média Absorbância (nm)
12,0	0,134
41,2	0,379
59,6	0,519
80,4	0,690
98,4	0,836
152,0	1,147

Figura E.1 – Obtenção da curva de calibração de carboidratos totais – glicose.



ANEXO F – Curva de calibração para determinação dos metabólitos secundários por Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID).

Tabela F.1 – Limite de quantificação e detecção, bem como os coeficientes das curvas de calibração para a determinação dos metabólitos secundários via GC-FID.

Compostos	LQ	LD	Coeficientes da curva				R ² baixa	R ² alta
			a (curva baixa)	b (curva baixa)	a (curva alta)	b (curva alta)		
metanol	11,3	3,4	2016	329	3121	-92386	0,9893	0,9792
etanol	11,7	3,5	8016	-4718	11494	-362421	0,9916	0,9712
acetona	11,4	3,4	182919	-1835808	16020	10000000	0,9015	0,8599
n-propanol	10,6	3,2	21081	-15532	43111	-4632847	0,9956	0,9777
ác. acético	10,7	3,3	33	290	73	-3789	0,9461	0,9992
isobutanol	9,9	3,0	49071	14416	73417	-3704665	0,9979	0,9425
n-butanol	9,5	2,9	34813	46719	100560	-10000000	0,9969	0,978
ác. propanóico	4,3	1,3	123	1232	525	-62546	0,9941	0,9913
ác. isobutírico	4,6	1,4	557	-1225	2947	-324739	0,9893	0,9921
ác. butírico	4,6	1,4	326	-835	1992	-276378	0,9914	0,9826
ác. valérico	5,0	1,5	1165	-2658	6339	-709001	0,9895	0,9961
ác. isovalérico	4,2	1,3	840	-1956	4469	-450644	0,9876	0,9934
ác. hexanóico	5,6	1,7	2598	-8154	10983	-1016241	0,9888	0,9982

LQ = Limite de Quantificação

LD = Limite de detecção

ANEXO G – Curva de calibração para determinação dos metabólitos secundários por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Tabela G.1 Compostos orgânicos identificados e quantificados por GC-MS por injeção de *headspace*. Tempo de retenção (T_R), massa molar (MM), temperatura de ebulição (T_b) e razão m/z do íon alvo para quantificação (Q_t).

Compostos	T_R (min)	MM (g mol⁻¹)	T_b (°C)	Q_t (m/z)
Acetona	1,19	58,08	56,0	43
Metanol	1,6	32,04	64,7	31
Etanol	1,96	46,07	78,4	31
2-Butanol	3,28	74,12	100,0	45
1-Propanol	3,59	60,09	97,0	31
Isobutanol	5,10	74,12	108,0	43
1-Butanol	5,87	74,12	117,7	31
Ácido acético	7,52	60,05	117,9	43
Ácido propiônico	7,86	74,08	141,2	29
Ácido isobutírico	7,99	88,11	155,0	43
Ácido butírico	8,30	88,11	163,5	60
Ácido isovalérico	8,56	102,13	176,0	60
Ácido valérico	9,06	102,13	186,0	60

ANEXO H – Determinação de ácido láctico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Tabela H.1- Ácido láctico identificado e quantificados por CLAE. Tempo de retenção (T_R) e volume injetado.

Compostos	T_R (min)	Volume injetado (μL)
Ácido láctico	12,452	20

ANEXO I – Determinação da composição do biogás via Cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização por chama (FID) e detector de condutividade térmica (TCD).

Curvas analíticas obtidas para cada composto:

H_2 [tempo de retenção (t_r) = 4,1 min; equação (y) = $52468,5 x + 3859,96$; coeficiente de determinação (R^2) = 0,999],

CO ($Tr = 7,3$ min; $y = 3826,89 x - 1112,92$; $R^2 = 0,997$),

CH_4 ($Tr = 3,4$ min; $y = 713303 x + 17880,1$; $R^2 = 0,997$) e

CO_2 ($Tr = 13,8$ min; $y = 3302,37 x + 356,25$; $R^2 = 0,998$).

Figura I.1 - Cromatogramas referentes ao ponto de maior concentração da curva analítica obtida para a mistura padrão de gases H_2 , CO , CH_4 e CO_2 ($10,2$, $11,4$, $10,8$ e $10,9 \mu\text{mol mL}^{-1}$, respectivamente) quantificada nos detectores (A) FID e (B) TCD.

