

Ana Carolina Appelt Marques

Produção biológica de H₂ e CH₄ a partir do glicerol bruto sob
condições termofílicas

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra.
Sandra Imaculada Maintinguer

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

M357p Marques, Ana Carolina Appelt
Produção biológica de H₂ e CH₄ a partir do glicerol bruto
sob condições termofílicas / Ana Carolina Appelt Marques. –
Araraquara : [s.n.], 2021
134 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Sandra Imaculada Maintinguer

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção biológica de H₂ e CH₄ a partir do glicerol bruto sob condições termofílicas

AUTORA: ANA CAROLINA APPELT MARQUES

ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

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



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

p/



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

p/



Prof. Dr. JOSÉ ALBERTO DOMINGUES RODRIGUES (Participação Virtual)
Engenharia Química e de Alimentos / Escola de Engenharia Mauá - IMT - São Caetano do Sul

Araraquara, 11 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Ana Carolina Appelt Marques

Nome em citações bibliográficas: Marques, A.C.A.; A.C.A. Marques; Ana C. A. Marques ou Ana Carolina A. Marques; Appelt Marques, Ana Carolina.

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Pesquisa em Bioenergia. Rua 10 - de 880/881 a 2258/2259. Centro. 13500230 - Rio Claro, SP – Brasil. Telefone: (16) 997341808.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018-2021: Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Imaculada Maintinguer.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: Biogás; Glicerol; Fermentação anaeróbia.
Grande área: Ciências Biológicas
Setores de atividade: Eletricidade, gás e outras utilidades; Esgoto e atividades relacionadas; Fabricação de coque, de produtos derivados do petróleo e de biocombustíveis.

2014-2018: Graduação em Química.
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil.
Título: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO DE GRAFITE E POLICAPROLACTONA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM PRODUTO DERMATOLÓGICO.
Orientador: Prof. Dra. Marilza Castilho Terezo.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017-2018: Iniciação Científica
Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil.
Bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT).
Título: Construção e aplicação de eletrodos compósitos para detecção de compostos de interesse farmacêutico.

2017-2017: Extensão Universitária Modern Bioelectrochemistry. (Carga horária: 4h).
Sociedade Brasileira de Eletroquímica e Eletroanalítica, SBEE, Brasil.

2019-2019: Treinamento em Operação e manutenção básica no equipamento Cromatógrafo a gás, modelo GC-2014A e software GCsolution, marca Shimadzu. (Carga horária: 12 horas). Rio Claro, Brasil.

2019-2019: Treinamento em Operação e manutenção básica no equipamento Cromatógrafo a gás, composto por: GC-2014AT; SPL-2014 e software LabSolutions GC Lite, marca Shimadzu. (Carga horária: 16 horas). Rio Claro, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Vínculo Institucional

2014-2016: Vínculo: estudante

Enquadramento Funcional: Bolsista CAPES de Mestrado em Biotecnologia.

Regime: Dedicção exclusiva.

Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brasil.

Vínculo Institucional

2017-2018: Vínculo: Bolsista

Enquadramento Funcional: Bolsa FAPEMAT de Iniciação Científica

Regime: Dedicção exclusiva

Vínculo Institucional

2015-2016: Vínculo: Bolsista

Enquadramento Funcional: Bolsista UFMT de Monitora de Ensino

Carga horária: 600h anual

Outras informações: Monitora Remunerada de Química Geral II

IDIOMAS

Inglês em nível intermediário (escrita, leitura e conversação)

Espanhol em nível básico

PRÊMIOS E TÍTULOS

2018: Prêmio Severino Meirelles. Melhor trabalho de Iniciação Científica na área de ciências exatas e da terra da Universidade Federal de Mato Grosso no período de 2017-2018. Prêmio concedido pelo trabalho intitulado: “Desenvolvimento de biossensor enzimático baseado em peroxidase de bocaiúva”, orientado pela Profa. Dra. Marilza Castilho Terezo.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo completo submetido em periódico

RODRIGUES, Caroline Varella; SILVA, Daiana Camila da; **MARQUES, Ana Carolina Appelt**; PACHIEGA, Renan; PIRES, Lorena Oliveira; MAINTINGUER, Sandra Imaculada. Butanol production by anaerobic biological process with pure 2 and mixed cultures from agroindustrial wastes. **Renewable Energy**.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos expandidos)

Apresentação de Trabalho

1. **Ana Carolina Appelt Marques**; Sandra Imaculada Maintinguer. Co-digestão do glicerol bruto de usina de biodiesel em resíduos orgânicos sob condições termofílicas. Apresentação de poster no III Bioenergy Workshop, IPBEN, Unesp, Rio Claro - SP, 2019;
2. **Ana Carolina Appelt Marques**; Sandra Imaculada Maintinguer. Co-digestão do glicerol bruto de usina de biodiesel em resíduos orgânicos sob condições termofílicas. Apresentação de poster no VII Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, Florianópolis - SC, 2019;

3. **Ana Carolina Appelt Marques**; Sandra Imaculada Maintinguer. GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATORES ANAERÓBIOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS. Apresentação de poster no XI Fórum de desenvolvimento territorial e meio ambiente da Uniara, Araraquara – SP, 2019.
4. **A. C. A. Marques**, M. Castilho. Enzimático Baseado em Peroxidase de Bocaiúva. Apresentação oral no XXV Seminário de Iniciação Científica, UFMT, Cuiabá – MT, 2017.
5. C. Côrtes, **A. C. A. Marques**, S. K. Moccelini, A. J. Terezo e M. Castilho. Desenvolvimento de Biossensor Enzimático Baseado em Peroxidase de Bocaiúva para Determinação de Levodopa em Fármacos. Apresentação Oral no XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Natal – PE, 2017.

Participação em eventos científicos

1. III Bioenergy Workshop – IPBEN, Unesp, 2019 (Workshop);
2. VII Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, 2019 (Congresso);
3. XI Fórum de desenvolvimento territorial e meio ambiente da Uniara, 2019 (Fórum);
4. II Bioenergy Workshop – IPBEN, Unesp, 2018 (Workshop);
5. XXV Seminário de Iniciação Científica – UFMT, 2017 (Seminário);
6. 46th World Chemistry Congress, 2017 (Congresso);
7. XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017 (Simpósio);
8. III Escola de Química - UFMT, UFMG, UFSC, 2016 (Congresso);
9. II Escola de Química - UFMT, UFMG e UFSC, 2015 (Congresso);
10. I Escola de Química - UFMT, UFMG e UFSC, 2014 (Congresso).

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer a Deus, por me dar forças para chegar até aqui, guiando meu caminho e preparando o que estava por vir.

À minha mãe, Soeli, e a meu pai, Cesar, obrigada por aceitarem as minhas escolhas e estarem sempre me apoiando e me dando forças para continuar e me aguentarem falando sem parar sobre as coisas que eu estou fazendo. À minha irmã, Ana Luisa, por me aguentar falando de química e biologia, mesmo que ela não goste muito.

À minha orientadora Prof. Dra. Sandra Maintinguer, pela oportunidade, apoio e incentivo, me aceitando mesmo quando eu não sabia muita coisa de digestão anaeróbia e tendo caído de paraquedas nesse mestrado.

À Caroline Rodrigues, por me ajudar sempre que eu precisava, por mostrar direções, compartilhar conselhos e me dar caronas para Rio Claro. À Daiana, Daniele, Luan e Romário, por compartilharem seus conhecimentos comigo e por todo o apoio dado nesses dois anos.

Aos meus amigos Ane e Edu, por estarem presentes nesse processo também e entenderem como fazer pesquisa é puxado. Ter alguém que te entende e compartilha dos mesmos problemas que você é primordial para passar pelo processo.

Aos meus familiares de São Carlos, obrigada pelos momentos, risadas, incentivos, contribuições e apoio naqueles momentos de desespero, em que pensamos que não vamos conseguir. Vocês tornam a caminhada mais leve e gratificante. Sentirei muita falta das minhas viagens de fim de semana.

E obrigada a você que está lendo este trabalho.

RESUMO

O glicerol é o principal resíduo na produção de biodiesel. Uma alternativa viável seria sua aplicação por digestão anaeróbia, com gerações de hidrogênio e metano no biogás, além de outros produtos de valor agregado na fase líquida. A condição termofílica pode favorecer a geração de biogás a partir do glicerol, com vantagens na seletividade de microrganismos e na baixa solubilidade do biogás na fase líquida. Neste sentido, este estudo avaliou o potencial de bioconversão do glicerol bruto, em H_2 e CH_4 , sob condições termofílicas em 21 ensaios, com diferentes inóculos: lodo termofílico pré-tratado por ataque ácido (inóculo 1); lodo mesofílico pré-tratado por ataque ácido (inóculo 2); lodo termofílico pré-tratado por ataque ácido e enriquecido por diluições seriais (inóculo 3); lodo termofílico pré-tratado por choque térmico (inóculo 4) e lodo termofílico *in natura* (inóculo 5). Produções mais elevadas de H_2 foram verificadas com o inóculo 1, a $55^\circ C$, pH 5,5, sob modo estático, em meio de cultivo PYG modificado com glicerina PA. A seguir, os inóculos 1 e 3 foram testados em meio de cultivo PYG e RCM modificados, substituindo glicose P.A. por glicerol bruto (20 g DQO L^{-1}). O inóculo 3 foi avaliado na produção de H_2 por co-digestão de glicerol bruto (20 g DQO L^{-1}) e esgoto sanitário com suplementações de: (a) extrato de levedura; (b) peptona e; (c) extrato de levedura e peptona. Nesses ensaios foram obtidos respectivamente ($\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$): 28,94 (a); 16,60 (b) e; 39,74 (c). Ensaios com o inóculo 4 foram realizados em aumentos sucessivos de glicerol bruto co-digerido com esgoto sanitário, com gerações de H_2 ($\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$): 72,53; 141,94; 89,36 e 145,0 para as concentrações de 20, 30, 40 e 50 $\text{g DQO}_{\text{glicerol}} \text{ L}^{-1}$, respectivamente. O principal co-produto gerado foi etanol, além de butanol, propanol, 1,3-propanodiol, ácido acético e ácido butírico, com remoções de glicerol acima de 60%. Os efluentes dos ensaios fermentativos foram avaliados diretamente na geração de metano, produzindo ($\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$): 233,51; 41,59; 24,44 e 8,03. Análises de biologia molecular revelaram predomínios dos gêneros *Coprothermobacter* e *Acetomicrobium* (Inóculo 1), *Thermoanaerobacterium* (Inóculo 3) e *Coprothermobacter* e *Methanothermobacter* (Inóculo 5) que provavelmente estiveram envolvidos nas gerações de biogás, ácidos graxos voláteis e álcoois. A digestão anaeróbia termofílica do glicerol bruto é uma alternativa para o seu tratamento com consequente gerações dos biocombustíveis H_2 , CH_4 e etanol, além de metabólitos de valor agregado, principalmente 1,3 PD e butanol.

Palavras chaves: co-digestão, reatores anaeróbios em batelada, biogás, etanol, *Thermoanaerobacterium*

ABSTRACT

Glycerol is the main residue in the production of biodiesel. A viable alternative would be its application by anaerobic digestion, with generations of hydrogen and methane in biogas, in addition to other value-added products in the liquid phase. The thermophilic condition can favor the generation of biogas from glycerol, with advantages in the selectivity of microorganisms and in the low solubility of biogas in the liquid phase. In this sense, this study evaluated the bioconversion potential of crude glycerol, in H₂ and CH₄, under thermophilic conditions in 21 tests, with different inocula: pre-treated thermophilic sludge by acid attack (Inoculum 1); mesophilic sludge pretreated by acid attack (Inoculum 2); thermophilic sludge pre-treated by acid attack and enriched by serial dilutions (Inoculum 3); thermophilic sludge submitted to heat treatment (Inoculum 4) and thermophilic sludge in natura (inoculum 5). Higher H₂ yields were verified with inoculum 1, at 55°C, pH 5.5, under static mode, in PYG media modified with glycerin PA than others inocula. Next, the inocula 1 and 3 were tested in modified PYG and RCM media, replacing the glycerin PA with crude glycerol (20 g COD L⁻¹). The inoculum 3 was initially evaluated in the production of H₂ by co-digesting crude glycerol (20 g COD L⁻¹) in sanitary sewage with supplements of: (a) yeast extract; (b) peptone and (c) yeast extract + peptone. In these assays were obtained respectively (mmol H₂ L⁻¹): 28.94 (a); 16.60 (b) and 39.74 (c). Assays with the inoculum 4 were carried out in successive increases in the concentration of crude glycerol, yeast extract and sanitary sewage, with H₂ generations (mmol H₂ L⁻¹): 72.53; 141.94; 89.36 and 145.0 for concentrations of 20, 30, 40 and 50 g COD_{glycerol} L⁻¹, respectively. The predominant generation of ethanol was verified, in addition to butanol, propanol, 1,3-propanediol, acetic acid and butyric acid in the tests carried out, with glycerol consumption above 60%. The effluents from the fermentative tests were directly evaluated in the generation of methane, producing (mmol CH₄ L⁻¹): 233.51; 41.59; 24.44 and 8.03. Molecular biology analyzes revealed predominance of the genera *Coprothermobacter* and *Acetomicrobium* (Inoculum 1), *Thermoanaerobacterium* (Inoculum 3) and *Coprothermobacter* and *Methanothermobacter* (Inoculum 5) that were probably involved in the generations of biogas, volatile fatty acids and alcohols. Anaerobic thermophilic digestion of crude glycerol is an alternative for its treatment with consequent generations of biofuels H₂, CH₄ and ethanol, in addition to added value metabolites, mainly 1,3 PD and butanol.

Keywords: co-digestion, anaerobic batch reactors, biogas, ethanol, *Thermoanaerobacterium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel no Brasil	21
Figura 2 - Esquema de uma reação de transesterificação	22
Figura 3 - Exportação brasileira de glicerina bruta e glicerol ao longo dos anos	25
Figura 4 - Rotas bioquímicas para a fermentação do glicerol	29
Figura 5 - Esquema Operacional	43
Figura 6 – Esquema dos testes preliminares	44
Figura 7 - Esquema dos ensaios de geração de hidrogênio	44
Figura 8 - Esquema dos ensaios de geração de metano	45
Figura 9 - Sistema de medição volumétrica para quantificação do biogás gerado	57
Figura 10 - Produção temporal de H ₂ em reatores anaeróbios em batelada, a 55°C. Ensaios 1 e 2 operados respectivamente com inóculo 1 e inóculo 2, mantidos sob modo estático. Ensaios 3 e 4 operados respectivamente com inóculo 1 e inóculo 2 mantidos, a 120 rpm.....	62
Figura 11 - Produção temporal de H ₂ dos reatores anaeróbios em batelada operados com inóculo 1 (termofílico) e inóculo 2 (mesofílico) sob diferentes condições termofílicas: ensaios 5 e 6 (45°C) e, ensaios 1 e 2 (55°C).....	63
Figura 12 - Variação temporal do crescimento em reatores anaeróbios em batelada com o inóculo 3 (barras) e geração de hidrogênio (linha).....	66
Figura 13 - Variação temporal do pH durante o crescimento celular em reatores anaeróbios em batelada operados com o inóculo 3	67
Figura 14 - Geração temporal de H ₂ em reatores anaeróbios em batelada a alimentados com glicerol bruto em diferentes meios de cultivo.....	68
Figura 15 - Variação temporal do pH nos ensaios 8, 9 e 10	69
Figura 16 - Produção acumulada de H ₂ no Ensaio 11	71
Figura 17 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 11	72
Figura 18 - Produção acumulada de H ₂ no Ensaio 12	73
Figura 19 - Produção acumulada de H ₂ no Ensaio 13	74
Figura 20 - Produção acumulada de H ₂ no ensaio 14.....	75
Figura 21 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 14.....	76

Figura 22 - Produção acumulada de H ₂ no ensaio 15.....	77
Figura 23 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 15.....	78
Figura 24 - Produção acumulada de H ₂ no ensaio 16.....	79
Figura 25 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 16.....	80
Figura 26 - Produção acumulada de H ₂ no ensaio 17.....	81
Figura 27 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 17.....	83
Figura 28 - Produção acumulada de H ₂ de acordo com a equação de Gompertz modificada em reatores anaeróbios alimentados com glicerol bruto.....	86
Figura 29 - Produção acumulativa de metano nos ensaios 18 a 21	95
Figura 30 - Distribuição da abundância relativa dos gêneros no inóculo 1 ...	102
Figura 31 - Microscopia do inóculo 3 com predomínio de bacilos gram+	104
Figura 32 - Distribuição da abundância relativa dos gêneros no inóculo 3 ..	105
Figura 33 - Distribuição da abundância relativa dos gêneros no inóculo 5 ...	107
Figura 34 - Distribuição dos gêneros dos inóculos 1 (a), 5 (b) e 3 (c).....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos termofílicos produtores de H ₂ em reatores operados a 55°C	38
Tabela 2 - Meio de cultivo PYG modificado.....	46
Tabela 3 - Composição dos 21 Ensaios aplicados na geração de H ₂ e de CH ₄	48
Tabela 4 - Meio de cultivo RCM	50
Tabela 5 - Caracterização do glicerol bruto.....	59
Tabela 6 - Caracterização do esgoto sanitário	61
Tabela 7 - Variação do pH nos ensaios 1,2, 5 e 6.....	64
Tabela 8 - Consumo de DQO e de glicerol em reatores anaeróbios em batelada operados com glicerol bruto diluído em meio de cultivo	70
Tabela 9 - Geração de ácidos e álcoois no ensaio 11	72
Tabela 10 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois gerados na fermentação para o ensaio 14.....	75
Tabela 11 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois gerados na fermentação para o ensaio 15.....	77
Tabela 12 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois gerados na fermentação para o ensaio 16.....	80
Tabela 13 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois gerados na fermentação para o ensaio 17.....	82
Tabela 14 - Potencial de Produção de H ₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H ₂ (R _m), o tempo inicial da geração de H ₂ (λ), limites inferior e superior e R ² obtidos pela equação de Gompertz modificada.....	84
Tabela 15 – Principais resultados obtidos nos ensaios 11 a 17 alimentados com Glicerol Bruto e Esgoto sanitário	87
Tabela 16 - Comparação na geração de H ₂ e metabólitos a partir de Glicerol bruto com a literatura.....	94
Tabela 17 - Principais resultados obtidos nos ensaios 18, 19, 20 e 21 realizados com efluentes dos ensaios 14, 15, 16 e 17, respectivamente.....	96
Tabela 18 – Comparação da produção de metano a partir de efluentes fermentativos com a literatura	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-PD 1,3-propanodiol

ANP Agência Nacional de Petróleo

ADP Adenosina Di-Fosfato

ATP Adenosina Tri Fosfato

AFBR Anaerobic Fluidized Bed Reactor

CH₄ Metano gasoso

CSTR Continuous Stirred-Tank Reactor

DQO Demanda Química de Oxigênio

EPE Empresa de Pesquisa Energética

H₂ Hidrogênio Gasoso

ME Ministério da Economia

MONG Materiais Orgânicos Não Glicerol

NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídio, na forma oxidada

NADH Nicotinamida adenina dinucleotídio, na forma reduzida

PYG Peptone, Yeast Extract, Glicose (Peptona, Extrato de Levedura e Glicose)

ST Sólidos Totais

SV Sólidos Voláteis

TCO Taxa de Carregamento Orgânico

TRH Tempo de Retenção Hidráulica

UASB Upflow Anaerobic Sludge Blanket

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS.....	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1.	Biodiesel	19
3.1.1.	Legislação Nacional	19
3.1.2.	Processos de produção	21
3.2.	O Glicerol Bruto.....	24
3.3.	Digestão anaeróbia do glicerol bruto	26
3.4.	Metabolismo de digestão do glicerol.....	28
3.5.	Digestão anaeróbia termofílica	31
3.5.1.	<i>Geração de hidrogênio em condições termofílicas</i>	32
3.5.1.1.	<i>Microrganismos envolvidos na produção termofílica de H₂</i> 36	
3.5.2.	<i>Geração de metano em condições termofílicas</i>	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1.	Substratos.....	45
4.2.	Fontes de inóculo.....	45
4.3.	Pré-tratamentos	46
4.4.	Ensaio em Reatores Anaeróbios em Batelada	47
4.5.	Testes Preliminares em diferentes condições nutricionais e operacionais ⁴⁹	
4.5.1.	<i>Reatores operados com diferentes inóculos mantidos em modo estático e sob agitação de 120 rpm</i>	49
4.5.2.	<i>Reatores anaeróbios mantidos a diferentes faixas de termofilia</i>	49
4.5.3.	<i>Obtenção e aumento de Biomassa – diluições seriadas</i>	49
4.6.	Glicerol bruto co-digerido em diferentes meios de cultivo	50

4.7.	Glicerol Bruto co-digerido em esgoto sanitário	50
4.8.	Produção de metano	51
4.9.	Análises.....	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1.	Caracterização do glicerol bruto.....	59
5.2.	Caracterização do esgoto sanitário	60
5.3.	Ensaio de produção de H ₂	61
5.3.1.	Testes preliminares	61
5.3.1.1.	<i>Comparação da produção de H₂ em reatores anaeróbios em batelada mantidos sob modo estático e agitação, a 55°C</i>	61
5.3.1.2.	<i>Comparação da produção de H₂ sob diferentes condições termofílicas</i> 62	
5.4.	Obtenção do inóculo 3.....	65
5.5.	Glicerol bruto co-digerido em meio de cultivo	67
5.6.	Glicerol bruto co-digerido em esgoto sanitário.....	70
5.6.1.	<i>Comparação dos ensaios geradores de H₂</i>	83
5.6.2.	<i>Comparação dos resultados obtidos com a Literatura</i>	91
5.7.	Produção de metano	95
5.7.1.	<i>Comparação da produção de metano com a literatura</i>	97
5.8.	Caracterização dos inóculos	101
5.8.1.	<i>Inóculo 1</i>	101
5.8.2.	<i>Inóculo 3</i>	103
5.8.3.	<i>Inóculo 5</i>	106
6.	CONCLUSÕES	110
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	111
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	ANEXOS.....	124

1. INTRODUÇÃO

A busca por combustíveis renováveis impulsionou no Brasil a produção de biodiesel, devido, principalmente, a incentivos governamentais, como a adição obrigatória desse biocombustível ao diesel de petróleo, a qual se tornou mandatória em 2008, com a adição de 2% (B2) à matriz energética brasileira. As adições ocorreram gradualmente no decorrer dos anos, sendo 3% (B3) em 2009, 4% (B4) a partir de julho de 2009, 5% (B5) em 2011 e 2012 e 6% (B6) em 2014 (CÉSAR *et al.*, 2019). Em setembro de 2019, foi aprovado o aumento para 11% (B11), com o objetivo de alcançar 20% (B20) até 2030 (ANP, 2019).

O aumento da demanda gera uma maior produção de biodiesel e, conseqüentemente, de glicerol, visto que a cada 100 Kg de biodiesel produzido, são gerados 10 Kg de glicerol (SARMA *et al.*, 2012).

A digestão anaeróbia é um dos métodos mais úteis para converter o glicerol bruto em biogás, principalmente metano (BABA *et al.*, 2013), na qual os microrganismos podem utilizá-lo como fonte alternativa de carbono e energia, gerando produtos de valor agregado (SOLOMON *et al.*, 1995). Hidrogênio e metano podem ser produzidos através da decomposição do glicerol bruto por processos biológicos anaeróbios. Além disso, o glicerol bruto é benéfico para a digestão anaeróbia porque aumenta significativamente a produção de biogás (metano e hidrogênio) (HE *et al.* 2017). Nesse sentido, a produção de biogás através da fermentação anaeróbia, pode ser uma alternativa em utilizar o glicerol bruto (PRISCILLA *et al.*, 2009, SARMA *et al.*, 2012, RODRIGUES *et al.*, 2016), além de ser fortemente incentivada a partir de 2017, com o Renova Bio, que é uma política de Estado, que visa traçar uma estratégia para reconhecer o papel de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira.

Entre os parâmetros operacionais da produção de biogás, hidrogênio e metano, a temperatura é considerada uma variável chave, pois afeta tanto a quantidade de biogás produzido quanto o microrganismo, influenciando o crescimento microbiano, as vias metabólicas e a atividade enzimática. (AZBAR *et al.*, 2009; OTTAVIANO *et al.*, 2016). Recentemente, o processo termofílico recebeu mais atenção devido ao rendimento elevado de hidrogênio produzido, a partir da fermentação de águas residuárias contendo soro de leite (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; OTTAVIANO *et al.*,

2016), vinhaça de cana-de-açúcar (SANTOS *et al.*, 2014), entre outros. No processo de produção do biodiesel e biogás de forma integrada, o glicerol bruto deixa a etapa de destilação a altas temperaturas (70 °C) (CÉSAR *et al.*, 2019), o que implica pouca dependência de energia para o sistema, podendo reduzir os custos da planta de tratamento, valorizando a cadeia produtiva do biodiesel.

A maioria das pesquisas utilizando glicerol bruto como fonte de carbono para a geração de biogás utilizam reatores operados em condições mesofílicas, o que possibilita a exploração de processos termofílicos na biodigestão do glicerol bruto (COSTA *et al.*, 2017).

O tratamento do esgoto sanitário é um problema na maioria das cidades brasileiras e fruto de grande preocupação nas indústrias, visto as normas ambientais para descarte adequado deste resíduo, pois o mesmo tem potencial de impactar o meio ambiente, a qualidade de vida, a saúde da população e os custos com a saúde pública (ALCANTARA *et al.*, 2020). Visto a elevada carga orgânica do glicerol bruto e a necessidade de diluição para o processo de digestão anaeróbia, o esgoto sanitário, um efluente majoritariamente composto por água, nitrogênio e Fósforo, pode auxiliar nas remoções desse resíduo, com gerações de biogás e demais produtos de valor agregado.

Nesse sentido, essa pesquisa visou à produção de biogás, em duas etapas, H₂ e CH₄ em reatores anaeróbios em batelada, com diferentes inóculos, pela fermentação de glicerol bruto, co-digerido em esgoto sanitário, sob condições termofílicas.

2. OBJETIVOS

Geral: Remover glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel, através da digestão anaeróbia termofílica, com diferentes inóculos e produção de biogás.

Específicos:

1. Realizar procedimentos diferentes de pré-tratamento para inibir as arqueias metanogênicas;
2. Avaliar a produção de biogás em diferentes condições operacionais (modo estático e sob agitação);

3. Avaliar a produção de biogás em temperaturas termofílicas distintas (a 45°C e a 55°C);
4. Obter e enriquecer um consórcio de bactérias anaeróbias termofílicas produtoras de hidrogênio;
5. Avaliar a produção de hidrogênio através da co-digestão de glicerol bruto em meios de cultivo modificados e em esgoto sanitário;
6. Avaliar a produção de CH₄ a partir dos efluentes dos reatores alimentados com glicerol bruto em esgoto co-digerido em esgoto sanitário;
7. Identificar os consórcios anaeróbios geradores de biogás por técnicas de biologia molecular em larga escala.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiesel

O biodiesel caracteriza-se por ser um líquido de tonalidade amarela, imiscível com água e com um ponto de ebulição elevado. É um combustível não tóxico, quando purificado, e relativamente pouco inflamável, podendo ser misturado com o gasóleo em qualquer proporção (BRITO *et al.*, 2013).

Quimicamente, o biodiesel é definido como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural e pode ser produzido, juntamente com a glicerina, pela reação de triacilgliceróis (ou triglicerídeos) com álcool, comumente o etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido ou básico (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). A grande compatibilidade do biodiesel com o diesel convencional o caracteriza como uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos a diesel já existente no mercado, sem qualquer necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento dos motores.

3.1.1. Legislação Nacional

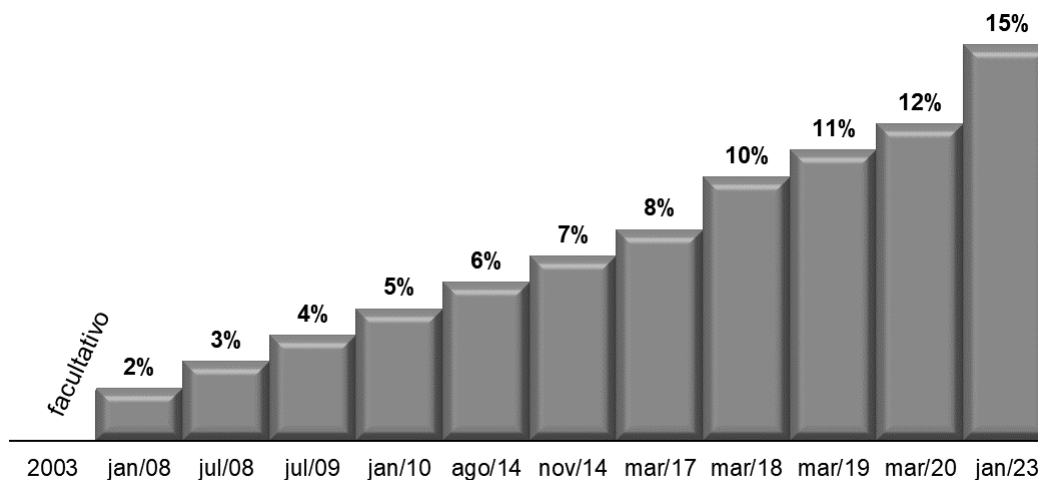
No Brasil, este biocombustível deve atender à especificação estabelecida pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Combustível (ANP), em sua Resolução ANP nº 07/2008, na qual o éster produzido é determinado como biodiesel ao completar

os requisitos dos 22 parâmetros estabelecidos na Resolução Técnica ANP. Nos Estados Unidos, vale a norma ASTM D6751 da American Society for Testing and Materials (ASTM) e na Europa, a norma EN 14214 do European Committee for Standardization (CEN).

Pela definição da lei nacional número 11.097 de 13/01/2005, o biodiesel pode ser classificado como um combustível alternativo, de natureza renovável, que possa oferecer vantagens socioambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel) (FERRARI *et al.*, 2004). Essa mesma lei, no seu artigo 2º, estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao diesel em percentuais que cresceram ao longo do tempo.

O Ministério de Minas e Energia estabeleceu um marco regulatório que “autoriza o uso comercial do biodiesel no Brasil, considerando a diversidade de oleaginosas disponíveis no País, a garantia do suprimento e da qualidade, a competitividade frente aos demais combustíveis e uma política de inclusão social. As regras permitem a produção a partir de diferentes oleaginosas e rotas tecnológicas, possibilitando a participação do agronegócio e da agricultura familiar”. O Ministério também estabeleceu que “os atos legais que formam o marco regulatório estabelecem os percentuais de mistura do biodiesel ao diesel de petróleo, a rampa de mistura, a forma de utilização e o regime tributário sobre o produto”.

Em janeiro de 2008 deu início a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao diesel, com um teor de 2% (B2). Seis meses depois, em julho do mesmo ano, a porcentagem aumentou para 3%. Em 2009, passou a 4%. Em 2010, foi a 5%. Os próximos aumentos só ocorreram em 2014, com 6% em agosto e 7% em novembro. Três anos depois, em 2017, o teor foi a 8%, depois a 10% em 2018 e a quantidade vem aumentando vagarosamente, com 12% em março de 2020. O objetivo principal é alcançar 15% de biodiesel no diesel até 2023 (Figura 1) (ANP, 2019).

Figura 1 - Evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel no Brasil

FONTE: ANP, 2019

3.1.2. Processos de produção

O biodiesel pode ser obtido através de óleos vegetais, como óleo de soja, óleo de mamona, óleo de palma, entre outros; ou gordura animal rica em triglicerídeos e com estruturas químicas semelhantes à dos óleos vegetais. As gorduras animais incluem sebo bovino, banha de porco, gordura de frango, óleo de peixe, entre outros resíduos do gênero (SILVA *et al.*, 2014).

De uma maneira geral, monoésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer óleo vegetal. No entanto, existem restrições a alguns tipos de óleos considerados não ideais. Uma propriedade indesejada é o alto índice de iodo, que torna o biodiesel mais susceptível à oxidação e inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel. Entretanto, este problema pode ser superado pela adição de antioxidantes (RAMOS *et al.*, 2011).

Outra questão importante está relacionada às propriedades de fluxo do biodiesel a baixas temperaturas. O biodiesel produzido a partir de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos saturados tende a apresentar problemas de solidificação quando utilizados nestas condições. Assim, as quedas bruscas de temperatura são responsáveis pelo aumento da viscosidade de ésteres saturados que, eventualmente, podem causar o entupimento dos filtros de óleo e do sistema de

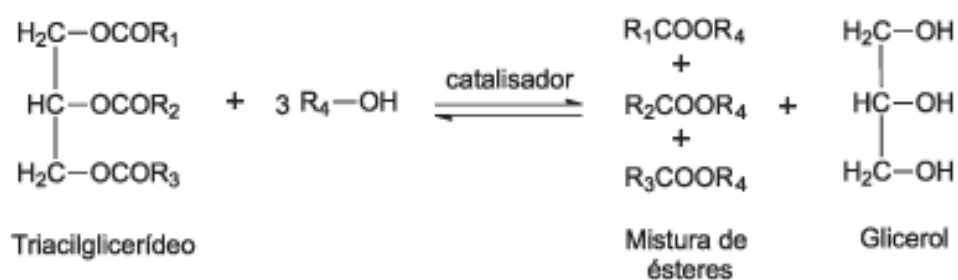
injeção. Este mesmo problema é observado no diesel de petróleo pela presença de materiais parafínicos, que pode ser minimizado em ambas as matrizes pelo uso de aditivos (RAMOS *et al.*, 2011).

Os processos mais usados na produção de biodiesel são: transesterificação e esterificação. Entretanto o processo de transesterificação é o mais utilizado, em razão da reação ocorrer somente em uma etapa, ser mais rápida com o uso do catalisador e poder ocorrer em pressão ambiente, conforme descrito a seguir.

Na reação de transesterificação, o triglicerídeo reage com três moléculas de álcool na presença de um catalisador para a obtenção de ésteres (o biodiesel) e glicerina. Esta reação é reversível e seu rendimento depende essencialmente da relação molar entre o óleo e o álcool, da temperatura de reação, do álcool utilizado, da quantidade e do tipo de catalisador (ácido ou base forte) e também do tempo de reação (VIEIRA *et al.*, 2011).

A estequiometria da reação de transesterificação requer que a relação seja de 3:1 de álcool em relação ao triglicerídeo (Figura 2) podendo-se utilizar proporções superiores, de forma a obter elevada produção de ésteres. Como se trata de uma reação reversível, o álcool, normalmente, é usado em excesso para deslocar o equilíbrio no sentido dos produtos (MA; HANNA, 1999). Além disso, é possível utilizar vários tipos de álcoois para a produção de biodiesel, como por exemplo metanol, etanol, propanol ou butanol. Contudo, o metanol e o etanol são os álcoois mais frequentes neste tipo de reação, devido às elevadas eficiências de geração de biodiesel a partir de óleos e gorduras.

Figura 2 - Esquema de uma reação de transesterificação



A transesterificação pode ser conduzida por catalisadores ácidos ou básicos, tanto em condições homogêneas quanto heterogêneas. Normalmente, são utilizados catalisadores homogêneos alcalinos, como o hidróxido de sódio. No entanto, catalisadores ácidos, como o ácido sulfúrico, também podem ser usados (PINTO *et al.*, 2005). Entretanto, para teores de ácidos graxos livres maiores que 1%, esta estratégia torna-se impraticável, devido ao consumo excessivo do catalisador e a perda considerável do potencial de rendimento em biodiesel devido à formação de sabão que impede a separação final do biodiesel da glicerina (VIEIRA *et al.*, 2011). A estratégia ideal para estes materiais é a de converter ambas as frações (ácidos graxos livres e triglicerídeos) em biodiesel. Para este objetivo, duas reações podem ser conduzidas sequencialmente: uma etapa de esterificação dos ácidos graxos livres, seguida de uma etapa de transesterificação alcalina em meio homogêneo para produzir ésteres alquílicos simples a partir dos triglicerídeos remanescentes (VIEIRA *et al.*, 2011).

Após a transesterificação, obtêm-se uma massa reacional final composta por duas fases, que são separáveis por decantação e/ou centrifugação. Glicerol Bruto compõe a fase mais pesada e uma mistura de ésteres metílicos de ácido graxo constitui a fase mais leve. Após a separação, o glicerol bruto obtido apresenta uma porcentagem de impurezas em sua composição, sendo eles os catalisadores, álcoois, ácidos graxos e sais. Estas impurezas dependem da natureza do óleo vegetal ou da gordura animal utilizada e do tipo de catalizador empregado na preparação deste biocombustível (CÉSAR *et al.*, 2019)

Entretanto, a produção do biodiesel por transesterificação apresenta sérios inconvenientes que limitam a sua produção e aumentam o seu custo. Dentre estes, podem-se destacar a elevada corrosão dos reatores, a lenta e incompleta separação dos ésteres da fase que contém glicerol, além da reação de saponificação, favorecida principalmente quando o teor de ácidos graxos livres é maior que 1,0% (VIEIRA *et al.*, 2011). Dessa forma, novas rotas para a obtenção do biodiesel tornam-se importantes para o processo, principalmente quando se tem óleos vegetais com altos teores de ácidos graxos livres.

A formação de ésteres por meio da reação entre um ácido graxo livre e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido é chamada esterificação e vem sendo considerada outra rota promissora para a

obtenção de biodiesel. As reações para a produção de ésteres já encontram diversas aplicações industriais como na produção de perfumes, aromatizantes, plásticos, produtos farmacêuticos e plastificantes (VIEIRA *et al.*, 2011).

O processo de transesterificação é preferível à esterificação devido à maior disponibilidade de matérias-primas naturais ricas em triglicerídeos, mas o processo de esterificação tem sua importância por ser um processo alternativo, pois possibilita a utilização de matérias ricas em ácidos graxos livres presentes em resíduos e subprodutos de processamentos industriais da biomassa, destacando os óleos brutos, borras ácidas, óleos usados em frituras e ainda produtos de origem animal, como a banha ou o sebo (JUAN; ZHANG; YARMO, 2007). Esses materiais graxos apresentam menor custo agregado em relação à matéria utilizada no processo de transesterificação (CARDOSO; NEVES; SILVA, 2008).

3.2. O Glicerol Bruto

Glicerol é um álcool simples e também é conhecido como 1,2,3-propanotriol. Em condições ambientes, é um óleo líquido, viscoso, sem cheiro ou coloração e solúvel em água (QUISPE *et al.*, 2013) e possui um gosto adocicado. Já o glicerol bruto oriundo da transesterificação apresenta características distintas dependendo do triglicerídeo, do álcool e do catalizador utilizados. Além disso, devido à presença de três grupos hidroxila hidrofílicos, é uma molécula estável, solúvel em água, não oxidando em condições normais (PERRY *et al.*, 1997).

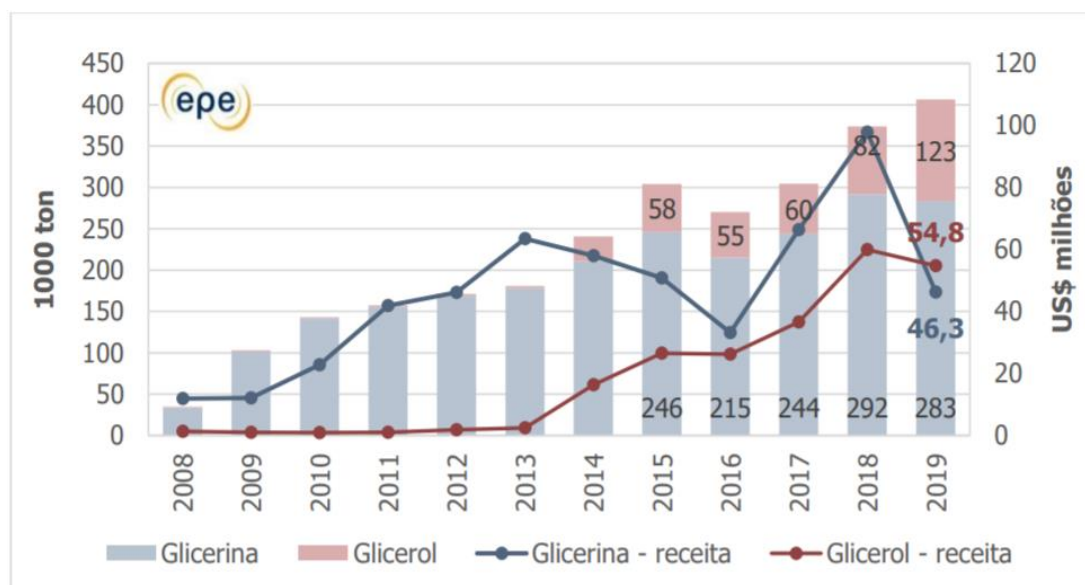
Algumas usinas realizam processos de acidificação/neutralização para ajustar o pH e evaporação/destilação para separar água e metanol do glicerol bruto e reutilizá-los no processo (QUISPE, *et al.* 2013). De maneira geral, o glicerol bruto oriundo de transesterificação com metanol possui 50 a 70% de glicerol, 10 a 20% de metanol, 5 a 10% de sais, 3 a 10% de água, 1 a 5% de ácidos graxos e 5% de materiais orgânicos não glicerol (MONG) (QUISPE, *et al.* 2013).

Estima-se que 10 a 20% do volume total de biodiesel gerado é constituído de glicerol bruto. Então, com o aumento da produção desse biocombustível por países como EUA, Brasil e Indonésia, conseqüentemente aumentou a disponibilidade de glicerol bruto no mercado, ocasionando uma queda no seu valor (QUISPE, *et al.*,

2013). Atualmente, a Ásia, em especial a China, é a líder desse mercado, comprando esse glicerol bruto para purificá-lo e aplicá-lo na produção de diversos setores industriais, como as indústrias farmacêuticas, de higiene pessoal, alimentícia, entre outros (QUISPE *et al.*, 2013). Porém, devido à grande produção de biodiesel em países como Brasil e Indonésia, o glicerol bruto está desvalorizado, chegando a custar 0,22 reais Kg⁻¹ (Biodiesel Br, 2019).

No Brasil, estima-se que tenham sido produzidas 0,6 milhão de toneladas de glicerol bruto, dos quais foram exportadas 283 mil toneladas (Figura 3). Já a receita obtida com a exportação de glicerina bruta foi de 46,3 milhões de dólares, 52,7% a menos do que foi obtido em 2018, devido à maior oferta no mercado provocando queda no preço internacional deste produto. A China continua como o maior destino das exportações, com 90,3% do total (ME, 2020).

Figura 3 - Exportação brasileira de glicerina bruta e glicerol ao longo dos anos



FONTE: ME, 2020

Com o aumento da fração de biodiesel no diesel ao longo dos anos, o volume de glicerol bruto produzido será muito maior e necessita-se fazer algo para agregar valor a esse subproduto. O destino mais comum desse glicerol bruto é a purificação, pois, em valores superiores a 90% de glicerol livre, esse composto pode ser utilizado

em diversas reações químicas, gerando produtos de maior valor agregado. As formas mais comuns de purificar esse coproduto são (ARDI, 2014):

- Neutralização e remoção do metanol;
- Destilação a vácuo;
- Adsorção de troca iônica;
- Adsorção usando carvão ativa;
- Tecnologia de separação de membrana.

Essas tecnologias apresentam diversas desvantagens, como por exemplo, a destilação a vácuo tem necessidade elevada de energia e manutenção; a adsorção de troca iônica gera um novo resíduo (água de lavagem), requerendo tratamento, além de ser inviável para gliceróis que contêm alto teor de sal; o uso de carvão ativado reduz a cor, mas é ineficiente na remoção de outras impurezas; o uso de membranas ainda está em fase de pesquisa, o que aumenta o seu valor de aplicação; e, a adicionar ácido repetidamente resultaria em baixo rendimento de glicerol, além de requerer uma purificação adicional (ARDI, 2014).

Devido a demanda energética, ao valor de implantação das tecnologias e o fato de o glicerol purificado não ser o produto almejado pela usina de biodiesel (especificamente), essas técnicas não são aplicadas. Por outro lado, existe um processo que não é tão oneroso, trata o glicerol bruto e ainda pode gerar produtos com valor agregado: a digestão anaeróbia.

3.3. Digestão anaeróbia do glicerol bruto

A digestão anaeróbia é um processo de decomposição da matéria orgânica, ou compostos de carbono, (carboidratos, proteínas, lipídeos, entre outros) por microrganismos na ausência de oxigênio (SÁ *et al.*, 2014).

O glicerol pode ser utilizado por muitos microrganismos para o seu crescimento e tem sido extensivamente estudado pelo seu potencial de produção de hidrogênio. O conteúdo energético de glicerol puro é 19,0 MJ Kg⁻¹; e para o glicerol bruto é 25,30 MJ Kg⁻¹, que pode ser devido à presença de metanol e vestígios de biodiesel. Tal conteúdo de energia elevada no glicerol bruto indica um potencial para ser o substrato eficaz na produção de hidrogênio (SARMA *et al.*, 2012)

Na literatura, estão disponíveis diversos artigos com ensaios que foram realizados utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono da digestão anaeróbia, tanto na produção de hidrogênio, como na produção de metano. Os materiais que originaram esse subproduto são variáveis, provendo de óleos vegetais, gordura animal ou óleo de cozinha usado.

Liu *et al.* (2012) estudou a conversão de glicerol bruto em hidrogênio e outros materiais de valor agregado através da fermentação anaeróbia em batelada com solo orgânico como inóculo. A produção de hidrogênio no *headspace* e 1,3-propanodiol (1,3-PD) na fase líquida foi examinada em diferentes tempos de retenção de hidrogênio, que foram controlados por intervalos de coleta de gás (GCIs) e tempos iniciais de coleta de gás (IGCTs). O glicerol bruto foi purificado de duas formas (P1 e P2) e, posteriormente, foram testados em três concentrações diferentes (3, 5 e 7 g L⁻¹). O tempo de retenção mais longo (maior GCI e maior IGCT) levou a menor rendimento de hidrogênio, mas maior rendimento de 1,3-PD. O glicerol P2 na concentração de 7 g L⁻¹ teve o maior rendimento de 1,3-PD (0,65 mol mol⁻¹ glicerol consumido) no GCI/IGCT de 20 h/65 h e o maior rendimento de hidrogênio (0,75 mol mol⁻¹ glicerol consumido) no GCI/IGCT de 2,5 h/20 h), respectivamente.

Baba *et al.* (2013) realizaram um balanço energético na produção de metano a partir de glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel, em uma planta piloto de 50 m³ de volume, com 30 m³ de volume de trabalho. A taxa de carregamento (TCO) de 1 ml_{glicerol} 1 L⁻¹_{reator} dia⁻¹ obteve melhores resultados, gerando 141,3 m³ CH₄ m⁻³ reator no período de um ano, obtendo, também, uma produção excedente de energia equivalente a 106% da energia de entrada. Assim, o estudo mostrou que o glicerol bruto é um recurso atrativo, que pode ser usado tanto como matéria-prima para a produção de metano quanto como fertilizante líquido.

Rodrigues *et al.* (2019) realizou experimentos com glicerol bruto oriundo da transesterificação de óleo de cozinha reciclado. Neste estudo, também foi comparado a geração de biohidrogênio por culturas sub-tropicais mistas e puras, tendo o glicerol bruto como fonte de carbono. O glicerol bruto foi pré-tratado por ajuste de pH. Dois ensaios foram realizados em reatores anaeróbios em batelada, para verificar a produção de hidrogênio a partir da bioconversão bruta de glicerol com: (I) cultura mista e (II) cultura pura. As experiências foram conduzidas a 37°C, pH inicial de 5,5 para o ensaio I e 7,0 para o ensaio II, com 20 g de DQO/L de glicerol bruto. O remoção de

glicerol bruto foi de 56,2% e 88,0% para o ensaio I e II, respectivamente. Os rendimentos de hidrogênio foram 0,80 mol de H₂/mol de glicerol para o ensaio I e 0,13 mol de H₂ mol /de glicerol para o ensaio II.

3.4. Metabolismo de digestão do glicerol

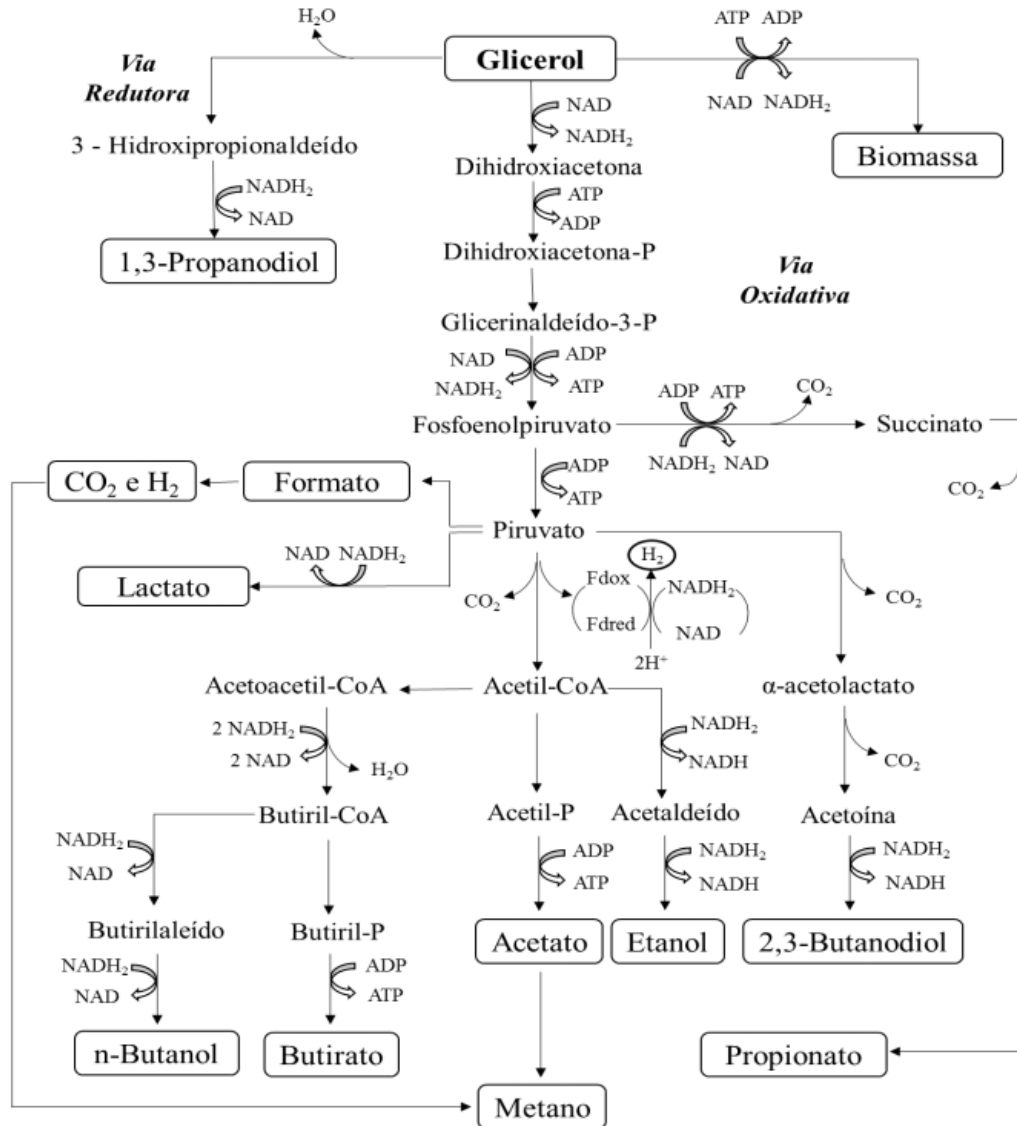
O metabolismo do glicerol e produção de hidrogênio podem ser dados por meio de duas rotas, a oxidativa e a redutiva, conhecida para algumas espécies produtoras de hidrogênio como a *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter*. Para metano, diversos microrganismos já foram descritos, como *Methanosaeta* sp., *Methanosarcina* sp. e *Methanobacterium* sp. (PHUKINGNGAMET *et al.*, 2011; LOVATO *et al.*, 2012; DINH, *et al.*, 2014).

Na rota redutiva (Figura 4), o glicerol é convertido em 3-hidroxi propionaldeído, reação esta catalisada pela coenzima B₁₂, a qual é dependente da enzima glicerol desidratase e relacionada à diol desidratase. A seguir, a 3-hidroxi propionaldeído é reduzido a 1,3 propanodiol e o NAD⁺ é regenerado a NADH₂ pela enzima dependente 1,3 propanodiol oxidoreductase (DROŹDŹYŃSKA *et al.*, 2011). Na rota oxidativa (Figura 4), o glicerol é primeiramente convertido a dihidroxiacetona, reação esta catalisada pela enzima glicerol desidrogenase, com a geração de NADH₂. Depois, a enzima glicolítica dihidroxiacetona kinase fosforila a dihidroxiacetona. Então, o produto é convertido a fosfoenolpiruvato, gerando ATP e NADH₂. Posteriormente, o fosfoenolpiruvato é convertido em piruvato, o qual, nessa rota, poderá gerar diversos produtos, como lactato, acetato, butirato, entre outros (DROŹDŹYŃSKA *et al.*, 2011 e SARMA *et al.*, 2012).

Inicialmente, o piruvato é convertido à acetilcoenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono e hidrogênio via redução da ferredoxina (Fd) catalisada pela oxidoreductase ferredoxina pirúvico. A ferredoxina (Fd) reduzida é então oxidada pela hidrogenase que reproduz Fd oxidada e gás hidrogênio (SARMA *et al.*, 2012; COSTA, 2010). O piruvato também pode ser convertido à acetil-CoA e formiato, que pode ser convertido prontamente a hidrogênio e dióxido de carbono pelas bactérias, tais como *Escherichia coli*. O acetil-CoA é convertido em ácido acético, ácido butírico e etanol, dependendo dos microrganismos presentes e das condições ambientais. O NADH₂ é utilizado na formação do butirato, butanol e etanol e o NADH₂ residual pode ser oxidado

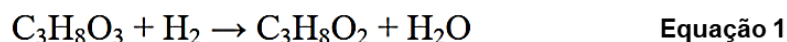
produzindo hidrogênio. O ATP é gerado na formação do ácido butírico e ácido acético a partir do acetil-CoA (COSTA, 2010).

Figura 4 - Rotas bioquímicas para a fermentação do glicerol



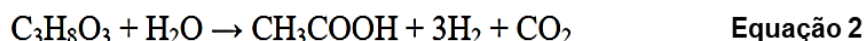
FONTE: Adaptado de BIEBL *et al.*, 1999.

Além do hidrogênio, a fermentação do glicerol produz diversos outros metabólitos que também possuem valor agregado. Pela rota redutora, produz 1,3-propanodiol (1,3-PD), consumindo H_2 (Equação 1).



O 1,3-PD é um monômero de diol, o qual é um composto químico conhecido para aplicações em cosméticos, solventes, adesivos, detergentes e resinas. Também pode ser aplicado na síntese de tereftalato de polítrimetileno (PTT), poliuretanos, poliésteres e compostos heterocíclicos, como indol e quinolonas (Sun et al., 2018; Vivek et al., 2017 *apud* RODRIGUES *et al.*, 2019).

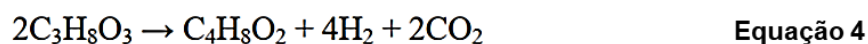
O maior rendimento teórico de hidrogênio a partir do remoção de glicerol é obtido na rota metabólica com geração de ácido acético (Equação 2), que, é encontrado no vinagre, mas também pode ser usado como solvente, em tinturaria, perfumaria, na produção de corantes, na fabricação de acetonas, em tintas, na seda sintética, na produção de acetato de vinila (do qual se obtém o plástico PVA), de ésteres, de acetato de celulose (fibras têxteis), de acetatos inorgânicos, de anidrido acético e cloreto de etila (usados em sínteses orgânicas) e em medicamentos.



O ácido propiônico é um ácido carboxílico que é usado na síntese de vitamina E, fibras de celulose, sabores artificiais de frutas, fragrâncias, perfumes, termoplásticos, drogas antiartríticas, atividade inibitória contra fungos, agentes antifúngicos em alimentos e rações, solventes e herbicidas. Seus sais são amplamente utilizados como conservantes de alimentos e rações (Zhang *et al.*, 2015a; VIVEK *et al.*, 2017; WANG e YANG, 2013). Sua produção não gera H₂ (Equação 3).



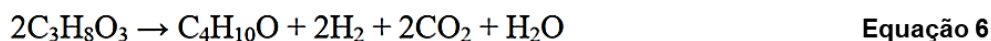
Na formação do ácido butírico, são gerados 4 mols de H₂ a cada 2 mols de glicerol (Equação 4). Esse ácido é usado na indústria farmacêutica, na síntese de aromáticos e em agentes emulsificantes e plastificantes. É naturalmente encontrado na manteiga. Os ésteres e sais do ácido butírico são usados em uma variedade de aplicações, incluindo perfumes, aromas e aditivos para alimentação animal.



O etanol é utilizado em termômetros, como solvente, combustível, etc. (GARLAPATI *et al.*, 2016). Na sua geração, são consumidos um mol de glicerol bruto e produz-se um mol de H₂ (Equação 5).



O butanol é um solvente frequentemente aplicado a reações de formação de éster e éter. Pode ser aplicado em *commodities* químicas, materiais e têxteis, por exemplo, na produção de tintas (2-butoxietanol), butil acrilato (produto químico em massa) e plastificante dibutilsebacato. Apresenta vantagens sobre outros bioprodutos orgânicos simples, tornando-se um novo biocombustível (KRASŇAN *et al.*, 2018). Dois mols de glicerol geram um mol de butanol e dois mols de H₂ (Equação 6)



Além desses metabólitos apresentados, também pode ser gerado na fermentação do glicerol: ácido láctico (SITTIJUNDA e REUNGASANG, 2017), 2,3-Butanodiol (RODRIGUES *et al.*, 2019), ácido cítrico (RODRIGUES *et al.*, 2019), ácido succínico (RODRIGUES *et al.*, 2019), entre outros.

3.5. Digestão anaeróbia termofílica

A temperatura é considerada um dos principais fatores de influência na produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia. As reações de fermentação podem ser conduzidas em faixas de temperatura mesofílica (25-40 °C), termofílica (40-65 °C), termofílica extrema (65-80 °C) e hipertermofílica (> 80 °C). A maioria dos estudos de produção de H₂ fermentativo tem utilizado a faixa de temperatura mesofílica. A temperatura ótima para cada processo depende do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos biodegradáveis e das condições operacionais do sistema (SÁ *et al.*, 2014).

A fermentação termofílica tem algumas vantagens em relação a produção de H₂ quando comparada com a condição mesofílica. O metabolismo em condições termofílicas tem inibição reduzida que é causada pela pressão parcial de hidrogênio, além de alguns microrganismos termofílicos produtores de H₂ terem uma maior tolerância à essa pressão. Entretanto, essa condição pode variar com o tipo de

substrato e os metabólitos solúveis. Outra vantagem é o maior favorecimento termodinâmico nas reações químicas e biológicas, com predomínio da via metabólica do acetato contrariamente à do etanol ou do lactato (O-THONG et al., 2009).

O hidrogênio apresenta baixa solubilidade em fase aquosa: 0,017 cm³ de H₂ por 1 cm³ de água a 1 bar e 37 °C (GUWY et al., 1997). A lei de Henry diz que a solubilidade de um gás dissolvido em um líquido é diretamente proporcional à pressão parcial do gás acima desse líquido. Então, levando-se em consideração essa lei, temperaturas mais elevadas acabam reduzindo a solubilidade do gás na fase aquosa e, conseqüentemente, a interação do gás com os microrganismos presentes no processo. Isso desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo e aumenta a eficiência da transferência líquido-gás deste composto. A influência da pressão parcial de hidrogênio na fase gasosa também é importante. Quando a concentração de hidrogênio se eleva, a síntese de H₂ torna-se termodinamicamente desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de produtos (LEVIN et al., 2004).

O custo de energia extra para manter as temperaturas das condições termofílicas é 1-2% maior do que as temperaturas mesofílicas. Essa margem poderia ser compensada alimentando os reatores com substratos quentes, como hidrolisado de palha de trigo, efluente de moenda de óleo de palma e melaço, entre outros, os quais são gerados a partir do processo a quente. As temperaturas termofílicas também são capazes de remover bactérias patogênicas e prevenir bactérias consumidoras de H₂ (homoacetogênicas e redutoras de sulfato) (O-THONG et al., 2019).

3.5.1. Geração de hidrogênio em condições termofílicas

2.5.1.1. Diversos Substratos

Outras fontes de carbono já foram estudadas como substratos da fermentação em condições termofílicas: glicose ou sacarose (HALLENBECK e BANEMANN, 2002; OTHONG et al., 2008), soro de queijo (AZBAR et al., 2009; OTTAVIANO et al., 2017), resíduos da indústria de cana de açúcar (SANTOS et al., 2014a; SANTOS et al.,

2014b; SANTOS, 2014c; FERREIRA et al., 2019), resíduos sólidos e águas residuárias (ZHANG, LIU e HERBERT, 2003; SHIN et al., 2004; FERREIRA et al., 2018), resíduos da indústria de óleo de palma (O-THONG et al., 2008), entre outros.

O-thong et al. (2008) examinaram a produção de H_2 da *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* cepa PSU-2 em Reator Anaeróbio de Manta de Lodo de Fluxo Ascendente (UASB) e reator anaeróbio de fluxo ascendente livre de transportadora (UA), ambos alimentados com sacarose e operando a $60^\circ C$. Grânulos metanogênicos pré-tratados com calor foram usados como material suporte para imobilizar a cepa de *T. thermosaccharolyticum* no reator UASB operado em um TRH variando de 0,75 a 24 h e taxa de carregamento de sacarose correspondente de 58,5 a 2,4 mmol de sacarose $L^{-1} h^{-1}$. O reator UA obteve uma taxa de produção de H_2 de 12,1 mmol $H_2 L^{-1} h^{-1}$, enquanto o reator UASB obteve uma taxa de 152 mmol $H_2 L^{-1} h^{-1}$. O biofilme da cepa PSU-2 de *T. thermosaccharolyticum* desenvolvido nos grânulos metanogênicos tratados no reator UASB melhorou substancialmente a retenção de biomassa (3 vezes) e a produção de hidrogênio (12 vezes) em comparação ao reator UA sem transportador.

Luo et al. (2010) investigaram os efeitos do tipo de lodo, da alcalinidade e do TRH na produção termofílica de hidrogênio fermentativo a partir de vinhaça de mandioca. Cinco tipos diferentes de lodo (lodo anaeróbio mesofílico de UASB tratando vinhaça de mandioca; digestato termofílico de vinhaça de mandioca de reator ASBR; digestato mesofílico de esterco de vaca de reator CSTR; Digestato mesofílico de esterco de galinha de reator CSTR; Lodo ativado residual da estação de tratamento de águas residuais municipal) foram utilizados como inóculos, sem pré-tratamento. Embora experimentos em batelada mostrassem que o lodo anaeróbio mesofílico era o melhor inóculo, o rendimento de hidrogênio com diferentes lodos foi bastante semelhante em experimentos contínuos na faixa de 82,9-92,3 ml $H_2 g SV^{-1}$. Os resultados obtidos em experimentos descontínuos não foram consistentes como os obtidos em experimentos contínuos e todos os lodos testados mostraram serem boas fontes para a produção contínua de hidrogênio termofílico a partir de vinhaça. A alcalinidade influente de 6 g de $NaHCO_3 L^{-1}$ e TRH de 24 h foi ideal para a produção de hidrogênio, com rendimento de 76 ml $H_2 g SV^{-1}$ e taxa de produção de hidrogênio de 3215 ml $H_2 L^{-1} d^{-1}$. O butirato foi o metabólito predominante em todos os testes. Com o aumento da alcalinidade superior a 6 g L^{-1} , a taxa de ácidos graxos

voláteis/etanol aumentou com a diminuição do rendimento de hidrogênio, devido às elevadas gerações de acetato e propionato observadas.

Santos *et al.* (2014c) avaliou o efeito de taxas de carregamento orgânica (TCO) elevadas (60,0-480,00 kg DQO m⁻³ d⁻¹) na produção de hidrogênio a 55°C, a partir de vinhaça de cana para 15.000 e 20.000 mg DQO L⁻¹, em dois reatores anaeróbios de leite fluidizado (AFBR 1 e AFBR 2). Obteve-se, para rendimento e teor de H₂, uma tendência decrescente com o aumento do TCO. O rendimento máximo de H₂ foi observado em AFBR 1 (2,23 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹). A produção volumétrica de H₂ foi proporcionalmente relacionada ao tempo de retenção hidráulica (TRH) aplicado de 6, 4, 2 e 1 h e verificou-se no AFBR 1 o maior valor (1,49 L H₂ h⁻¹ L⁻¹). Dentre os ácidos orgânicos obtidos, houve predomínio do ácido lático e do ácido butírico.

Ottaviano *et al.* (2017) usaram um reator anaeróbio de leite fluidizado (AFBR1 e AFBR2) para produzir continuamente hidrogênio sob condições termofílicas (55°C) usando uma gama de concentrações de soro de queijo (SQ) e tempos de retenção hidráulica (TRHs). As seguintes combinações de parâmetros de testes foram avaliadas: concentração de 4900 ± 200 mg de lactose L⁻¹ e TRHs de 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 h em AFBR1 e TRH de 6 h e concentrações afluentes de SQ de 2800 ± 100, 4900 ± 200, 6800 ± 300, 9800 ± 300 e 14.600 ± 300 mg de lactose L⁻¹ em AFBR2, respectivamente. Para AFBR1, a taxa máxima de produção de hidrogênio (HPR) obtida foi de 4,1±0,2 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ no TRH de 0,5 h, e o rendimento máximo de hidrogênio foi de 3,67 ± 0,59 mol H₂ mol lactose⁻¹ no TRH de 4 h. Para o AFBR2, o HPR máximo foi de 0,85±0,12 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ na concentração de 6800 ± 300 mg de lactose L⁻¹ e o máximo de rendimento foi de 2,64 mol H₂ mol lactose⁻¹ na concentração de 2800 ± 100 mg de lactose L⁻¹. Em ambos os reatores, os principais metabólicos gerados foram o ácido acético e o ácido butírico.

Ferreira *et al.* (2018) avaliaram a influência do tempo de retenção hidráulica (TRH) na produção de H₂ em reatores anaeróbios de leite fluidizado a temperaturas mesofílicas (30°C, AFBR-M) e termofílica (55°C, AFBR-T). Os reatores foram alimentados com água residuária sintética à base de sacarose (5 g de DQO L⁻¹) na HRT de 8, 6, 4, 2 ou 1 h. A taxa de produção de H₂ aumentou de 67,8 ± 14,8 para 194,9 ± 57,0 ml H₂ h⁻¹ L⁻¹ (AFBR-T) e de 72,0 ± 10,0 para 344,4 ± 74,0 ml H₂ h⁻¹ L⁻¹ (AFBR-M) quando a TRH diminuiu de 8 para 1 h. Os rendimentos máximos de H₂ para AFBR-T e AFBR-M foram 1,93 ± 0,21 e 2,68 ± 0,48 mol H₂ mol sacarose⁻¹,

respectivamente. Os principais metabólitos gerados foram o ácido acético, o ácido butírico no reator AFBR-M além de acetato e etanol no reator AFBR-T.

Ferreira *et al.* (2019) avaliou os efeitos do tempo de retenção hidráulica (TRH) (8 a 1h) na produção de H₂ a partir do caldo de cana (5 g DQO L⁻¹) em reatores anaeróbios de leito fluidizado em condições mesofílicas (30°C, AFBR-30) e termofílicas (55 ° C, AFBR-55). Em TRHs de 8 e 1 h no AFBR-30, as taxas de produção de H₂ foram 60 e 116 ml H₂ h⁻¹ L⁻¹, os rendimentos de hidrogênio foram 0,60 e 0,10 mol H₂ mol⁻¹ hexose. No AFBR-55, a diminuição no TRH de 8 para 1 h aumentou a taxa de produção de hidrogênio para 501 ml H₂ h⁻¹ L⁻¹ no TRH de 1 h. O rendimento máximo de hidrogênio de 1,52 mol H₂ mol⁻¹ hexose foi observado no TRH de 2 h.

2.5.1.2. Glicerol Bruto

Escassos são os trabalhos com glicerol bruto como substrato na geração de hidrogênio, sob condições termofílicas. Entretanto, sua aplicação pode ser válida uma vez que o processo de obtenção do biodiesel pode ocorrer a elevadas temperaturas.

Sittijunda e Reungsang (2012) analisaram como as composições dos meios de cultivo afetavam a produção termofílica de bio-hidrogênio, a partir de glicerol bruto, usando superfície de resposta com desenho de composto central para otimização do processo. Foram testadas diferentes concentrações de glicerol bruto, ureia, endonutrientes e hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄). As composições ótimas de meio de cultivo foram 20,33 g L⁻¹ de glicerol residual, 0,16 g L⁻¹ de ureia, 3,97 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,20 g L⁻¹ de endo-nutriente, com rendimento máximo de 1470,19 ml H₂ L⁻¹. A diferença entre o rendimento observado (1502,84 ml H₂ L⁻¹) e o previsto foi de 2,22%. Os metabólicos de fermentação gerados foram 1,3-propanodiol (1,3-PD), acetato, formiato, lactato, butirato, propionato e etanol.

Kanchanasuta e Sillaparassamee (2017) investigaram a fermentação termofílica de hidrogênio em dois estágios e o processo metanogênico mesofílico para produção de metano, com efluente da co-digestão do bolo decantador de óleo de palma (BD) e glicerol bruto (GB). Para o primeiro estágio termofílico, o reator gerador de hidrogênio com 2% m v⁻¹ de sólido total (ST) de BD e glicerol bruto foi operado em 4 dias de tempo de retenção hidráulica (TRH), com carga variável de 0,75-1,5% GB enquanto o reator gerador de metano com 2% m/v de sólido total (ST) de BD foi

operado aos 13 dias TRH. A taxa máxima de produção e o rendimento de hidrogênio no primeiro estágio termofílico obtido a partir da condição de co-digestão com 1,5% de GB foram respectivamente de 461 ml de $H_2 L^{-1} d^{-1}$ e 23 L $H_2 kg^{-1}$ de ST adicionados. O glicerol bruto foi considerado uma substância alternativa de ajuste de pH no reator gerador de hidrogênio. Na condição de co-digestão com GB a 0,75%, o pH foi mantido na faixa superior a 5,3 durante todo o processo de fermentação. A produção semi-contínua de metano com efluente do reator de H_2 , com concentração de glicerol bruto a 0,75%, alcançou 736 ml de $CH_4 L^{-1} d^{-1}$ e rendimentos de 44 L $CH_4 kg ST^{-1}$.

Sittijunda e Reungsang (2020) investigaram a produção simultânea de hidrogênio, etanol e 1,3-PD a partir do glicerol puro e do glicerol bruto em condições termofílicas ($55 \pm 4^\circ C$), em reator UASB, observando o efeito da taxa de carregamento orgânico (TCO) (25, 37,5, 50, 62,5 e 75 g $L^{-1} d^{-1}$). Rendimentos máximos de hidrogênio de 2,90 e 2,05 mol $H_2 mol^{-1}$ glicerol foram alcançados com TCO de 62,5 g $L^{-1} d^{-1}$ de glicerol puro e bruto, respectivamente. O balanço de DQO sob TCO ótimo usando glicerol puro e bruto como substrato indicou que 1,3-PD e hidrogênio foram os principais produtos gerados, seguidos de etanol. A eficiência de conversão de energia para hidrogênio, 1,3-PD e etanol foi de 34,87, 39,54, 17,88%, respectivamente.

Processos termofílicos exibem baixa solubilidade de H_2 na fase aquosa e melhores condições de transferência líquido-gás de H_2 (AKUTSU *et al.*, 2009). Nesse sentido, a produção de bioenergia a temperaturas elevadas poderá aumentar a produção de H_2 e CH_4 , selecionando microrganismos produtores com eficiências mais levadas do que os mesofílicos (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, o funcionamento a temperaturas elevadas pode melhorar o desempenho da fermentação, promovendo a hidrólise dos compostos orgânicos e facilitando a degradação pela comunidade microbiana na geração de bioenergia (KIM *et al.*, 2011).

3.5.1.1. Microrganismos envolvidos na produção termofílica de H_2

Os produtores termofílicos de H_2 podem ser classificados em dois grupos pela temperatura ótima de crescimento: termófilos moderados que sobrevivem de 55 a 60°C para o crescimento e, extremófilos que crescem a temperaturas superiores a 70°C. Muitas espécies termofílicas, como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *C. thermocellum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*,

Thermoanaerobacterium thermoferax, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Clostridium thermolacticum*, *T. elfii*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermobrachium celere*, *Thermovorax subterraneus*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *C. saccharolyticus*, *Thermococcus kodakaraensis*, e *Pyrococcus furiosus*, são relatadas com produtoras de hidrogênio. Os gêneros *Thermoanaerobacterium* sp. e *Clostridium* sp. estão no grupo de bactérias estritamente anaeróbias, formadoras de endósporos e produtoras de carboidratos de degradação da enzima hidrolítica (celulose, xilana, pectina, quitina e amido) e considerados produtores moderados de H₂ termofílicos. Além disso, o gênero *Thermoanaerobacterium* sp possuem a temperatura ideal para crescimento de 60°C e podem utilizar carboidratos para a produção de gás H₂ concomitante com butirato e acetato (O-THONG, MAMIMIN, KONGJAN e REUNGSANG (2019)).

A espécie mais encontrada na literatura é a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, seja em cepas puras, predominante em consórcios enriquecidos ou em lodos anaeróbios. Entretanto, outros microrganismos também podem obter vantagem, dependendo do substrato utilizado (Tabela 1).

O-thong *et al.* (2008) isolaram uma cepa bacteriana termofílica de produtora de H₂ em um reator alimentado com efluente de moinho de óleo de palma (POME) e identificada como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* usando a análise do gene 16S rRNA. A bactéria isolada, designada como *T. thermosaccharolyticum* PSU-2, apresentou rendimento elevado e taxa de produção de H₂. Nos testes em batelada, sacarose, xilose e amido foram os substratos preferidos. A cepa produziu H₂ dentro de uma ampla faixa de pH (4,5–8) e temperatura (45–70°C), com a temperatura ideal de 60°C e o pH inicial ideal em torno de 6,25. A taxa máxima de produção de H₂ foi registrada no período de 8-16 h de operação, na fase exponencial tardia. A produção de H₂ foi drasticamente reduzida em fermentação prolongada (24 h) e interrompida em pH 4,5 devido ao acúmulo de ácidos orgânicos. O rendimento e a taxa máxima de produção de H₂ em sacarose (20 g L⁻¹), pH 6,25 e 60°C foi 2,53 mol H₂ mol⁻¹ hexose e 12,12 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. A cepa realizou fermentação etanol-acetato em meio de cultivo com adições de nitrogênio inorgânico, além de fermentação butirato-acetato em meio de cultivo alterado com nitrogênio orgânico.

Tabela 1– Microrganismos termofílicos produtores de H₂ em reatores operados a 55°C

Substrato	Reator	Microrganismos	pH	Rendimentos	Referências
Resíduos alimentares	Batelada	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolytium</i> e <i>Desulfotomaculum geothermicum</i>	Variável	0,9-1,8 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	SHIN <i>et al.</i> (2003)
Vinhaça de cana diluída	AFBR	<i>Thermoanaerobacterium sp.</i> <i>Clostridium sp.</i>	4,0	0.78 L H ₂ h ⁻¹ L ⁻¹	SANTOS <i>et al.</i> (2014)
Vinhaça de cana de açúcar	Anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente	<i>Caloramator</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Oxobacter</i> , <i>Thermoanaerobacterium</i> e <i>Thermohydrogenium</i>	6,5	3,7 mol mol ⁻¹ carboidratos totais	FERRAZ JUNIOR <i>et al.</i> (2015)
Soro de queijo	AFBR1 e AFBR 2	<i>Thermoanaerobacterium</i> e <i>Thermohydrogenium kirishiense</i>	4,0-4,5	3,67 ± 0,59 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose em 0,5h 2,64 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose em 6h	OTTAVIANO <i>et al.</i> (2017)

FONTE: Próprio autor

Azbar *et al.* (2009) investigou a produção de hidrogênio a partir do resíduo de processamento de queijo via fermentação anaeróbia utilizando comunidades microbianas mistas em condições termofílicas. O biogás continha 5 a 82% (45% em média) de hidrogênio e a taxa de produção de hidrogênio variava de 0,3 a 7,9 L H₂ L⁻¹ h⁻¹ (2,5 L H₂ L⁻¹ h⁻¹ em média). A concentração total de ácidos graxos voláteis mensuráveis no efluente (em função do DQO influente) variou entre 118 e 27.012 mg L⁻¹, composta principalmente por ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido propiônico, formato e lactato. A produção de etanol e acetona também foi monitorada. A comunidade microbiana no biorreator em diferentes TRHs foi identificada e apresentou 99% de similaridade com a bactéria *Thermoanaerobacteriaceae bacterium* não cultivada.

Zhang, Cao e Ren (2019) investigaram o efeito da bioaugmentação na produção de hidrogênio termofílico, adicionando *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 a três tipos de consórcios microbianos: lodo de palha de milho (RCS), composto de esterco de vaca (CDC) e lodo de digestão anaeróbia (SAD), na digestão de um hidrolisado de palha de milho. Os resultados dos testes em batelada indicaram que a bioaugmentação com uma pequena quantidade da cepa *T. thermosaccharolyticum* W16 (5% do total de microrganismos) aumentou o rendimento de hidrogênio (RCS: de 8,78 a 9,90 mmol H₂ g⁻¹ de carboidrato; CDC: de 8,18 a 8,42 mmol H₂ g⁻¹ de carboidrato; SAD: 8,55 a 9,17 mmol H₂ g⁻¹ de carboidrato). O processo de bioaugmentação também influenciou a composição dos metabólitos solúveis no sentido de produções mais elevadas de acetato e reduzidas de butirato para RCS, com acúmulo de acetato e reduções de etanol para SAD.

3.5.2. Geração de metano em condições termofílicas

Estudos com produção termofílica de metano a partir do glicerol bruto são escassos, quando comparados com a produção de hidrogênio. Testes em temperaturas mesofílicas foram documentados, porém com outros substratos e com reatores em dois estágios.

Yang *et al.* (2008) avaliou a eficiência da biodegradação de resíduos sintéticos contendo glicerol, utilizando biorreatores de leito fixo com espuma de poliuretano como meio suporte, operados em modo semi-contínuo, sob condições mesofílicas (35

°C) e termofílicas (55 °C). O TRH foi estabelecido em 14 dias. Os inóculos utilizados foram lodo mesofílico e termofílico, advindo de uma planta de tratamento de águas residuárias. A alimentação com o meio sintético sofreu variação na taxa de carregamento orgânico (TCO) de 0,25 a 0,70 g L⁻¹ d⁻¹. Em seguida, uma TCO de 1,0 g L⁻¹ d⁻¹ foi aplicada nos reatores termofílicos e o pH manteve-se em torno de 7,5. No entanto, sob as mesmas condições operacionais, o pH foi inferior a 7,0 nos reatores mesofílicos. Este trabalho demonstrou também que a temperatura exerce efeito sobre a degradação anaeróbia do glicerol, pois em condições termofílicas obtiveram eficiência média de remoção de carbono orgânico de 87%, enquanto que em condições mesofílicas a eficiência foi de 50%. O reator termofílico apresentou a maior produção de metano de 0,45 L CH₄ g⁻¹ DQO_{aplicada} em uma TCO de 0,70 g L⁻¹ d⁻¹, sendo que o rendimento na produção de metano foi reduzido com a elevação da TCO sob condição mesofílica. Análises de biologia molecular para o Domínio Archaea de amostras do reator termofílico foram principalmente *Methanobacterium* sp. e *Methanosarcina* sp.

Lee *et al.* (2010) testaram um processo de fermentação termofílica em dois estágios (reator de fermentação H₂ e reator de CH₄) usando 10% de resíduos sólidos totais de alimentos (TS) em taxa de carregamento orgânico (TCO) variáveis. O sistema foi configurado para produzir H₂ e CH₄, analisando o consumo de DQO, a remoção de nitrogênio e ajuste do pH, recirculando o lodo para um tanque de armazenamento de lodo como um tampão alcalino, para ocorrência de desnitrificação. O pH no reator de fermentação H₂ foi mantido na faixa de 5,4-5,7 usando a recirculação de lodo. As taxas médias de produção de H₂ (11,1 L L⁻¹ d⁻¹) e CH₄ (47,4 L L⁻¹ d⁻¹) foram alcançadas em TCOs de 39 no reator de fermentação H₂ e 4,16 g DQO L⁻¹ d⁻¹ no reator de CH₄, respectivamente. Estes resultados sugeriram que a estabilidade a longo prazo do processo contínuo de dois estágios pode ser alcançada com sucesso pela recirculação de lodo de alcalinidade de 6,7-7,5 g L⁻¹ como CaCO₃, sem adição externa de tampão químico.

Kongjan, O-Thong e Angelidaki (2011) estudaram o processo de dois estágios para a produção de hidrogênio termofílico extremo (a 70°C) e metano termofílico (a 55°C) a partir do hidrolisado de palha de trigo em reatores UASB (UASB-H₂ e UASB-CH₄). Rendimentos específicos de hidrogênio e metano de 89 ml H₂ g⁻¹ SV (190 ml H₂ g⁻¹ açúcares) e 307 ml CH₄ g⁻¹ SV, respectivamente, foram alcançados

simultaneamente com a eficiência geral de remoção de SV de 81% operando com tempo total de retenção hidráulica (TRH) de 4 dias. As bactérias produtoras de hidrogênio dominantes no reator UASB-H₂ foram *Thermoanaerobacter wiegeli*, *Caldanaerobacter subteraneus* e *Caloramator fervidus*. Entretanto, o reator UASB-CH₄ foi dominado por *Methanosarcina mazei* e *Methanothermobacter defluvii*. Os resultados deste estudo sugeriram que o processo anaeróbio em dois estágios pode ser usado efetivamente para recuperação de energia e para estabilização de hidrolisado em condições anaeróbias.

Niu *et al.* (2013) investigou a fermentação termofílica de metano de esterco de galinha (EG) com um total de sólidos (TS) de aproximadamente 10% e a relação com a inibição pela amônia. Os ensaios foram realizados em reatores CSTR, a 55°C e TRH de 30 dias. O esterco foi diluído em água de torneira. Os autores demonstraram que um aumento gradual no nitrogênio amoniacal total (NAT) para 6000 mg L⁻¹ foi observado no caso da fermentação de EG bruta. Um aumento distinto no acúmulo de ácidos graxos voláteis combinado com uma baixa produção de metano de 0,29 L g⁻¹ SV ocorreu em um NAT de 4000 ~ 5000 mg L⁻¹. A produção de biogás cessou completamente quando o NAT atingiu 8.000 mg L⁻¹ após a adição de NH₄HCO₃. A sensibilidade elevada da metanogênese a NAT e amônia livre (AF) foi confirmada quantitativamente. A análise da comunidade microbiana revelou diferenças significativas nos metanogênicos hidrogenotróficos e nos metanogênicos acetoclásticos antes e depois da inibição.

Fernandéz *et al.* (2015) avaliou a digestão anaeróbia termofílica do soro de queijo utilizando uma configuração de um e dois estágios (H₂ e CH₄) em um reator sequencial em batelada (SBR). O processo de estágio único apresentou desempenho estável com produção específica de metano de 314,5 ± 6,6 L CH₄ kg⁻¹ DQO a um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 8,3 dias. Ao contrário, o processo em duas etapas apresentou instabilidades em um TRH de 12,5 dias com acúmulo de ácido sendo observado na fase de metanogênese em um estágio anterior. Este comportamento foi um indicativo de inibição do processo por concentrações elevadas de íons sódio e potássio, como consequência do controle do pH durante a fase de produção de H₂. Apesar deste fenômeno, foi verificado o maior valor de produção específica de metano (340,4 ± 40 L CH₄ kg⁻¹ DQO). O desempenho do processo de digestão anaeróbia também foi analisado por espectroscopia no infravermelho com

transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H). O processo em duas etapas mostrou maior conteúdo em grupos triacilgliceróis provavelmente associados a alterações nos complexos lipídicos de arqueias como resposta microbiana a um ambiente de maior salinidade.

Begum *et al.* (2020) investigou o potencial de biometano (BMP) de um lixiviado de aterro de alta resistência com pH reduzido (5,0), concentração elevada de sólidos (16%) e de matéria orgânica (170 g DQO L^{-1}) em quatro diferentes cargas orgânicas iniciais (170, 85, 42,5 e 21 g DQO L^{-1}) e com relações substrato/inóculo de 0,5; 1; 2 e 3, em temperaturas mesofílicas ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) e termofílicas ($55 \pm 2^\circ\text{C}$). A maior quantidade de CH_4 foi obtida com 42,5 g DQO L^{-1} , independentemente da razão substrato/inóculo e da temperatura. Os resultados de maior teor de metano em biogás nessa concentração de carga orgânica foram 72% e 74% em temperaturas mesofílicas e termofílicas, respectivamente. Cerca de 80-100% do metano cumulativo foi produzido dentro de 15 dias em reatores termofílicos e 40-72% em reatores mesofílicos. O estudo cinético revelou uma redução de 75% na fase de latência em reatores termofílicos em comparação aos mesofílicos. Cerca de 80% de redução da DQO foi obtida na temperatura mesofílica e 90% na temperatura termofílica, em uma carga orgânica de 42,5 g DQO L^{-1} e 21 g DQO L^{-1} . Os autores concluíram que o tratamento de lixiviado de aterro rico em ácidos, tanto em temperatura mesofílica quanto termofílica, é viável em uma concentração ideal de 42,5 g DQO L^{-1} . No entanto, o tratamento do resíduo em temperatura termofílica superou o tratamento mesofílico ao longo do tempo de digestão.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, foi possível inferir que:

1. As técnicas químicas empregadas atualmente no processo de tratamento do glicerol bruto derivado da produção de biodiesel são onerosas, principalmente na parte de purificação, levando ao acúmulo deste resíduo e sua venda para o exterior, com baixo valor agregado. Além disso, esse problema só tende a crescer, visto que o resíduo é produzido em grandes quantidades, principalmente devido às políticas públicas nacionais adotadas, junto às crescentes adições de biodiesel no diesel.

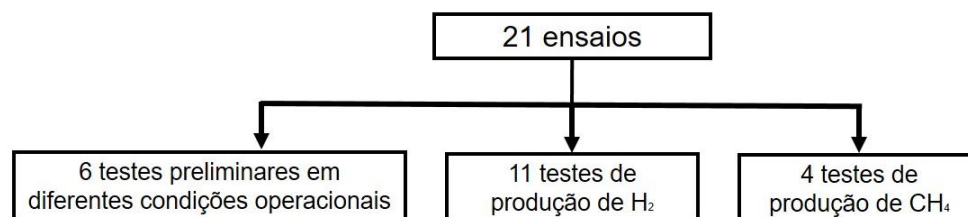
2. A aplicação da digestão anaeróbia gera produtos mais valiosos, como o biogás e/ou ácidos e álcoois, e o glicerol bruto não precisa necessariamente ser purificado.
3. A produção de biogás a partir de glicerol bruto em condições termofílicas é pouco explorada na literatura, ao contrário dos processos mesofílicos, porém apresenta potencial na geração de bioenergia, podendo aumentar a produção de H_2 e de CH_4 , gerando maiores quantidades de determinados ácidos e álcoois em função da diversidade do consórcio microbiano utilizado.

Frente à escassez de trabalhos realizados sob a aplicação do glicerol bruto por processos anaeróbios sob condições termofílicas, essa dissertação visou estudar a produção de biogás e demais produtos de valor agregado em dois estágios; fermentação seguida de metanogênese, sob condições termofílicas ($55^\circ C$).

4. MATERIAL E MÉTODOS

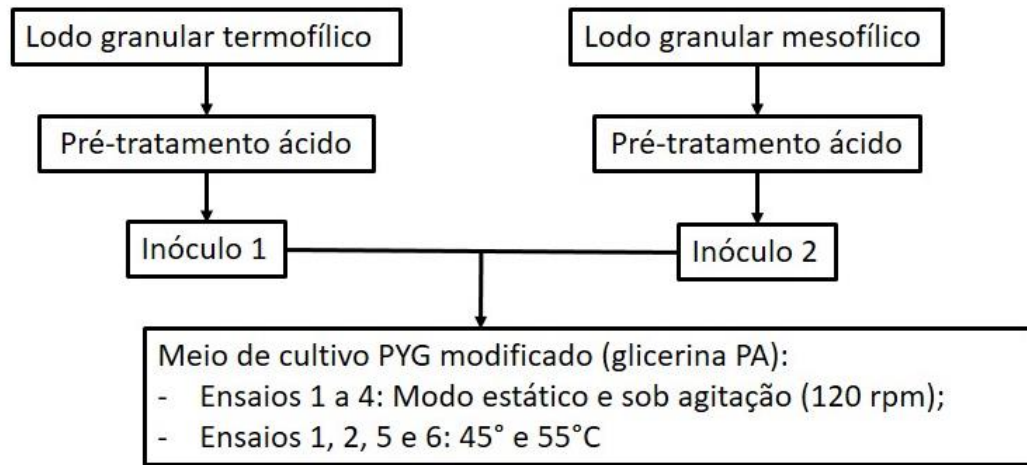
Foram realizados 21 ensaios. Inicialmente foram montados 6 testes preliminares a fim de selecionar as melhores condições para a produção de hidrogênio. A seguir, foram realizados 11 testes com glicerina P.A. e meios de cultivo, tanto com lodo granular pré-tratado, quanto com lodo granular pré-tratado e enriquecido. Ensaios com glicerol bruto e esgoto sanitário ocorreram com dois tipos de inóculos, testando diferentes condições de meio reacional. Por fim, ensaios de produção de metano foram realizados, em diferentes concentrações de carga orgânica, que eram os efluentes dos ensaios de geração de hidrogênio (Figura 5, 6, 7 e 8).

Figura 5 - Esquema Operacional



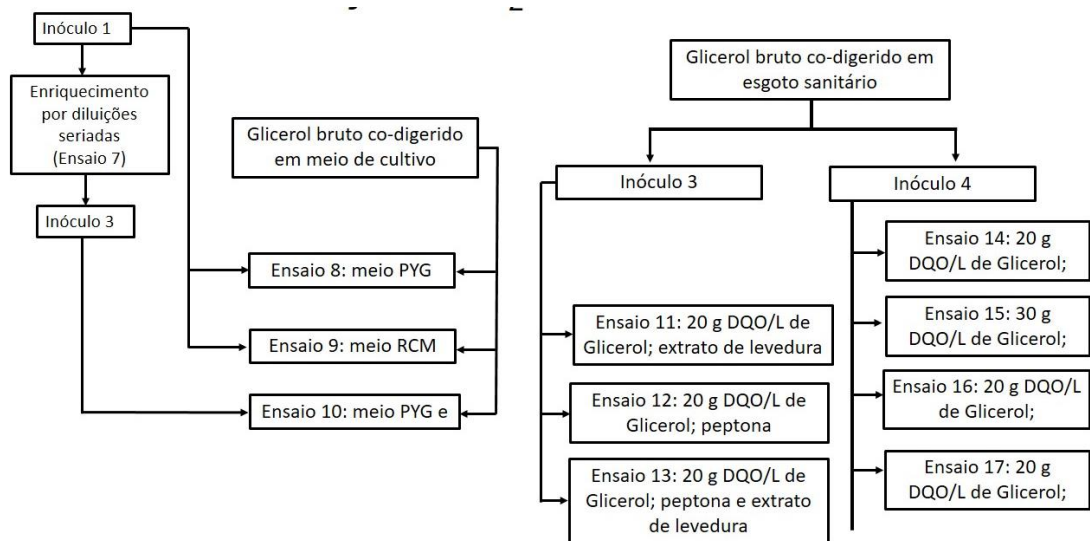
FONTE: Próprio Autor

Figura 6 – Esquema dos testes preliminares

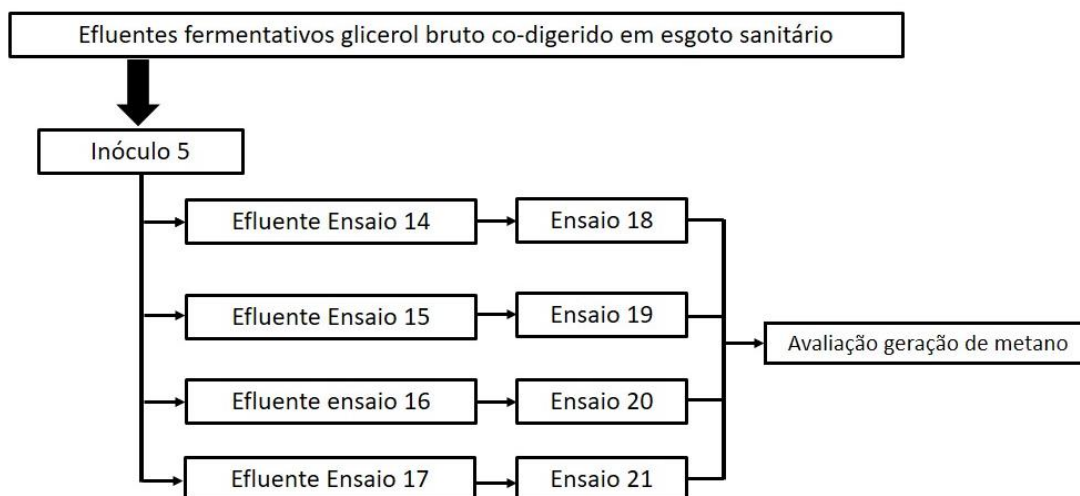


FONTE: Próprio Autor

Figura 7 - Esquema dos ensaios de geração de hidrogênio



FONTE: Próprio Autor

Figura 8 - Esquema dos ensaios de geração de metano

FONTE: Próprio Autor

4.1. Substratos

1. Glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel por processo de transesterificação a partir de óleo de soja (BioBrotas - Brotas-SP).
2. Esgoto sanitário, fornecido pela Estação de Tratamento de Esgoto de Rio Claro - SP.

4.2. Fontes de inóculo

Foram utilizados 2 lodos granulares provenientes de reatores, sendo: Lodo granular termofílico proveniente do tratamento da vinhaça (Usina São Martinho), localizado em Pradópolis – SP e; Lodo granular mesofílico proveniente do abate de aves (Avícola DAKAR), localizada em Tietê – SP.

Dessa forma os inóculos foram nomeados:

- ◆ Inóculo 1 - lodo termofílico pré-tratado por ataque ácido;
- ◆ Inóculo 2 - lodo mesofílico pré-tratado por ataque ácido;
- ◆ Inóculo 3 - inóculo 1 pré-tratado por ataque ácido e enriquecido por diluições seriais;
- ◆ Inóculo 4 - lodo termofílico pré-tratado por choque térmico;

- ◆ Inóculo 5 - lodo termofílico sem pré-tratamento.

Os pré-tratamentos aplicados estão descritos a seguir.

4.3. Pré-tratamentos

Os inóculos foram macerados em almofariz e transferidos, separadamente, para reatores anaeróbios em batelada (2000 ml) contendo 1000 ml de *headspace* preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos e 1000 ml de meio de cultivo PYG (Peptone, Yeast Extract, Glucose) modificado (Tabela 2), com o objetivo de favorecer o crescimento das bactérias anaeróbias presentes na amostra. A modificação no meio de cultivo se deu pela adição de glicerina P.A., em substituição à glicose.

Os inóculos foram submetidos ao tratamento ácido expondo a biomassa a pH 3,0 por 24 h com o objetivo de inibir a metanogênese (ROSSI *et al.*, 2011) e obter consórcios de bactérias anaeróbias geradoras de gás hidrogênio. A seguir, os inóculos pré-tratados foram reativados e enriquecidos em reatores anaeróbios (500 ml) em batelada contendo meio de cultivo PYG modificado (250 ml) em pH inicial 5,5, mantidos a 55°C durante 48 h, com *headspace* (250 ml) preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos.

Tabela 2 - Meio de cultivo PYG modificado

Composição	g L⁻¹
Glicerina	10
Peptona	5
Extrato de levedura	5
Extrato de carne	5

FONTE: RODRIGUES *et al.*

O tratamento térmico foi realizado com o lodo termofílico in natura, por aquecimento a 100°C, durante 15 minutos, com posterior imersão em banho de gelo até que a temperatura atingisse 25°C (MAINTINGUER *et al.*, 2008), resultando no

inóculo 4. Análises esporádicas de determinação de H₂ por cromatografia gasosa foram realizadas após os pré-tratamentos realizados.

Foram realizados testes preliminares a fim de serem otimizadas as condições de trabalho sendo:

1. Melhor fonte de inóculo e pré-tratamentos;
2. Condições operacionais dos reatores mantidos sob modo estático e sob agitação e,
3. Diferentes condições termofílicas.

Tais testes estão descritos nos ensaios 1 a 7, descritos a seguir.

4.4. Ensaios em Reatores Anaeróbios em Batelada

Foram realizados 21 ensaios em triplicatas de reatores anaeróbios em batelada sob condições nutricionais e operacionais distintas (Tabela 3). Os ensaios 1 a 7 referiram-se a testes preliminares com variações de: fontes de inóculo, pH inicial, modo estático e agitação, faixas de temperatura e meios de cultivo conforme descritos a seguir. A partir da condição ideal para a geração de hidrogênio, os ensaios 8 a 17 foram realizados em diferentes concentrações de glicerol bruto. Nessa mesma linha, os ensaios 18 a 21 foram realizados com efluentes dos reatores anaeróbios em batelada geradores de H₂ (ensaios 14 a 17) aplicados para o consumo do glicerol bruto remanescentes e demais coprodutos gerados nessas fermentações. A seguir estão descritos detalhadamente a montagem dos ensaios.

Tabela 3 - Composição dos 21 Ensaios aplicados na geração de H₂ e de CH₄

Ensaio	Inóculo	Meio de Cultivo	Operação	pH	Temp.°C	Biogás
1	1	PYG mod (Glicerol PA)	modo estático	5,5	55	H ₂
2	2	PYG mod (Glicerol PA)	modo estático	5,5	55	H ₂
3	1	PYG mod (Glicerol PA)	120 rpm	5,5	55	H ₂
4	2	PYG mod (Glicerol PA)	120 rpm	5,5	55	H ₂
5	1	PYG mod (Glicerol PA)	modo estático	5,5	45	H ₂
6	1	PYG mod (Glicerol PA)	modo estático	5,5	45	H ₂
7	3	RCM mod (Glicerol PA)	modo estático	6,0	55	H ₂
8	1	PYG mod (Glic Bruto 20g DQO/L)	modo estático	6,0	55	H ₂
9	1	RCM mod (Glic Bruto 20g DQO/L)	modo estático	6,0	55	H ₂
10	3	RCM mod (Glic Bruto 20g DQO/L)	modo estático	6,0	55	H ₂
11	3	Glic bruto (20 g DQO L ⁻¹), esgoto sanitário, extrato de levedura	modo estático	6,0	55	H ₂
12	3	Glic bruto (20 g DQO L ⁻¹), peptona, extrato de levedura	modo estático	6,0	55	H ₂
13	3	Glic bruto (20 g DQO L ⁻¹), esgoto sanitário e peptona, extrato de levedura	modo estático	6,0	55	H ₂
14	4	Glic bruto (20 g DQO L ⁻¹), esgoto sanitário, extrato de levedura	modo estático	5,5	55	H ₂
15	4	Glic bruto (30 g DQO L ⁻¹), esgoto sanitário, extrato de levedura	modo estático	5,5	55	H ₂
16	4	Glic bruto (40 g DQO L ⁻¹), esgoto sanitário, extrato de levedura	modo estático	5,5	55	H ₂
17	4	Glic bruto (50 g DQO L ⁻¹), esgoto sanitário, extrato de levedura	modo estático	5,5	55	H ₂
18	5	Efluente do ensaio 14	modo estático	7,0	55	CH ₄
19	5	Efluente do ensaio 15	modo estático	7,0	55	CH ₄
20	5	Efluente do ensaio 16	modo estático	7,0	55	CH ₄
21	5	Efluente do ensaio 17	modo estático	7,0	55	CH ₄

FONTE: Próprio autor

4.5. Testes Preliminares em diferentes condições nutricionais e operacionais

4.5.1. Reatores operados com diferentes inóculos mantidos em modo estático e sob agitação de 120 rpm

Foram montadas triplicatas de reatores de 500 ml, com volume de trabalho de 300 ml, sendo 240 ml de meio de cultivo PYG modificado (Tabela 2) e 60 ml dos inóculo 1 e inóculo 2 e 200 ml de headspace preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, mantidos sob modo estático (Ensaio 1 e Ensaio 2) e sob agitação de 120 rpm (Ensaio 3 e 4), a 55°C por 90 horas. Foram realizadas análises de geração de H₂.

4.5.2. Reatores anaeróbios mantidos a diferentes faixas de termofilia

Triplicatas de reatores anaeróbios (500 ml) foram operados com volume de trabalho de 300 ml, sendo 240 ml de meio de cultivo PYG modificado (Tabela 2) e 60 ml dos inóculo 1 e inóculo 2 e 200 ml de headspace preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, mantidos sob modo estático, a 45°C (Ensaio 5 e 6) e a 55°C (Ensaio 1 e 2), separadamente, por 60 horas. Foram realizadas análises de geração de H₂, DQO e remoção de glicerol, conforme descrito a seguir.

4.5.3. Obtenção e aumento de Biomassa – diluições seriadas

O inóculo 3 foi enriquecido por diluições seriadas em reatores anaeróbios em batelada (100 ml) realizadas em meio de cultivo PYG modificado (50 ml) (Tabela 2), headspace (50 ml) preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, pH 5,5 e mantidos a 55°C, durante 72 horas. O reator de maior diluição positiva para o crescimento (10^{-5}) foi utilizado para o aumento dessa biomassa em reatores anaeróbios em batelada (500 ml).

Além disso para uma melhor adaptação do inóculo 3 ao meio de cultivo RCM - específico para *Clostridium acetobutylicum* - (Tabela 4), foram feitas reativações com aumentos gradativos de volume de reator (30 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml e 1L),

a cada 96 horas, mantidos a 55°C, com headspace preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos e pH inicial 6,0. Foram mensurados o crescimento da biomassa, produção de H₂ e o pH no maior volume (Ensaio 7), descritos a seguir.

Tabela 4 - Meio de cultivo RCM

Composição	g L⁻¹
Peptona	10,0
Extrato de carne	10,0
NaCl	5,0
Acetato de Sódio	3,0
Extrato de Levedura	3,0
Cloridrato de L-cisteína	0,5

FONTE: Adaptado de KHAMAISEH et al, 2012

4.6. Glicerol bruto co-digerido em diferentes meios de cultivo

Para a determinação do melhor meio de cultivo, em substituição à glicerina PA pelo glicerol bruto, foram montados os ensaios 8, 9 e 10, em triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (500 ml), conforme descrito anteriormente (Tabela 3), com 300 ml de volume de trabalho e 200 ml de headspace preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, a 55°C. Nesses ensaios foram verificados: geração de H₂, variação do pH e consumos de carga orgânica e de glicerol.

4.7. Glicerol Bruto co-digerido em esgoto sanitário

Nos ensaios subsequentes, foi substituído o meio de cultivo sintético por esgoto sanitário. Dessa forma, para a produção de H₂, pelo inóculo 3, foram testadas três variações de fonte nutricional: ensaio 11 com extrato de levedura (5 g L⁻¹); ensaio 12 com peptona (5 g L⁻¹); e ensaio 13 contendo extrato de levedura (5 g L⁻¹) e peptona (5 g L⁻¹). Os reatores anaeróbios em batelada (500 ml) foram montados em triplicata, com 300 ml de meio reacional, contendo 0,3 g de inóculo 3 (calculado a partir de

sólidos totais voláteis, cujo valor era 12,0 g L⁻¹), glicerol bruto (20 g DQO L⁻¹) e esgoto sanitário até completar o volume de meio reacional, headspace (200 ml) preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, pH 6,0, mantidos a 55°C, sob modo estático, por 72 horas. Foram quantificados: produção de H₂, variação de pH, consumos de carga orgânica e de glicerol.

Nos ensaios 14 a 17, foram testadas quatro concentrações de glicerol bruto: 20 g DQO L⁻¹ (Ensaio 14), 30 g DQO L⁻¹ (Ensaio 15), 40 g DQO L⁻¹ (Ensaio 16) e 50 g DQO L⁻¹ (Ensaio 17). Triplicatas de reatores de 500 ml foram montadas, contendo 300 ml de meio reacional, contendo 100 ml do inóculo 3, extrato de levedura (5 g L⁻¹) e esgoto sanitário até completar o volume, headspace (200 ml) preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, pH 5,5, mantidos a 55°C e sob modo estático, por até 96 horas. Foram analisadas: produção de H₂, variação de pH e consumos de carga orgânica e de glicerol.

4.8. Produção de metano

Os efluentes dos ensaios 14, 15, 16 e 17 foram utilizados na montagem de reatores para as produções de metano, assim distribuídos nos ensaios 18, 19, 20 e 21 (Tabela 3). Triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (500 ml) foram montados com 250 ml de meio reacional [200 ml de efluente e 50 ml de lodo granular termofílico sem pré-tratamento (inóculo 5)], com headspace (250 ml) preenchido com N₂ (99,99%) sob fluxo constante por 15 minutos, pH 7,0, mantidos a 55°C, sob modo estático.

4.9. Análises

- **Demanda Química de Oxigênio - DQO**

As amostras (1,25 ml) foram adicionadas com 0,75 ml 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. A seguir, as amostras foram colocadas em digestor de DQO (Nanocolor® VARIO C2) durante 2 horas a 150°C. Posteriormente, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm (APHA, 2005).

Essa análise foi realizada em todos os ensaios. A curva de calibração encontra-se no Anexo A.

- **Remoção de glicerol**

Os consumos de glicerina livre no glicerol foram quantificados segundo Bondioli e Bella (2005), sendo este um método alternativo à cromatografia líquida. Nele, a glicerina livre presente na amostra sofre oxidação na presença de metaperiodato de sódio, havendo a formação de formaldeído, que, por sua vez, reage com acetilcetona na presença de acetato de amônio, levando à formação de 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (Reação de Hantzsch), quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Essa análise foi realizada em todos os ensaios. A curva de calibração encontra-se no Anexo B.

- **pH**

Foram efetuadas leituras para determinação do pH nos reatores anaeróbios em batelada para as condições estudadas. O pH inicial foi ajustado durante a montagem dos reatores, conforme descrito anteriormente, com adições de HCl (1M) ou NaOH (1M) (APHA, 2005). Essa análise foi realizada em todos os ensaios e na caracterização do glicerol bruto e do esgoto sanitário.

- **Sólidos Totais Voláteis - STV**

Foram determinados de acordo com Alpha (2005). Cadinhos de porcelana foram calcinados em forno mufla a 550°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 1 hora e, em seguida, transferiu-os para dessecador até atingir a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, foram pesados em balança analítica (m_0). Triplicatas de amostras (25 ml) foram homogeneizadas e transferidas para os cadinhos, os quais foram colocados em estufa, a 105°C, por 24 horas. Depois, os cadinhos foram acondicionados no dessecador até o esfriamento, seguindo pela pesagem dos mesmos (m_1). Para a determinação de sólidos totais voláteis, os cadinhos retornaram ao forno mufla, na

mesma temperatura descrita anteriormente, por 2 horas. Os mesmos foram pesados após o resfriamento (m_2). Os cálculos foram feitos conforme as equações 7 e 8:

$$\text{Sólidos Totais} = \frac{(m_1 - m_0)}{V_{amostra}} \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Sólidos Totais Voláteis} = \frac{(m_2 - m_1 - m_0)}{V_{amostra}} \quad \text{Equação 8}$$

Essa análise foi realizada na determinação dos sólidos voláteis totais do inóculo 3.

- **Determinação de sabões**

A concentração de sabões presente no glicerol bruto foi quantificada por titulação e expressa como oleato de sódio, segundo a descrição da Sociedade Americana dos Químicos de Óleo (AOCS, 2017). Primeiro, preparou-se uma solução teste misturando-se 0,5 ml de solução de azul de bromofenol (0,5% em etanol) e 60 ml de acetona PA. A mistura foi titulada com HCl (0,1M) até a neutralização da mesma. Depois, adicionou-se 10 g de glicerol bruto à solução teste e aqueceu-se a mistura em banho maria (70°C) por 10 minutos, agitando vigorosamente. Posteriormente, titulou-se com solução de ácido clorídrico (0,1M). A neutralização completa do sabão leva à mudança de coloração do meio, que muda do azul (pH indicador) tornando-se amarela esverdeada. Sabendo que 304,4 g/mol é a massa molar do oleato de sódio, o teor de sabões é medido conforme a Equação 9, onde V é o volume de HCl, M é a concentração molar de HCl, e m é a massa de glicerol bruto. Essa análise foi utilizada na caracterização do glicerol bruto.

$$\% \text{Oleato de sódio} = \frac{V_{\text{ácido}} * M_{\text{ácido}} * 304,4}{m_{amostra}} * 100 \quad \text{Equação 9}$$

- **Determinação de Nitrogênio**

Determinação realizada pelo Método Kjeldahl (STANDARDS METHODS, 2012).

- **Crescimento Celular**

O crescimento celular foi verificado através da análise de absorvância da cultura a 600 nm (APHA, 2005). O crescimento foi realizado durante o aumento da biomassa (Ensaio 7).

- **Exames microscópicos**

Foram realizados testes de coloração de Gram no inóculo 3. A metodologia consistiu em cobrir o esfregaço com violeta-de-metila, deixando agir por 15 segundos. Após, escorrer o corante e lavar em um filete de água corrente. Cobrir a lâmina com lugol diluído e deixar por 1 minuto. Escorrer o lugol e lavar em um filete de água corrente. Adicionar álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina e, depois, lavar em um filete de água corrente. Por fim, cobrir a lâmina com safranina por 30 segundos e lavar em um filete de água corrente. Deixar secar ao ar livre.

As leituras das lâminas foram feitas através de luz comum, em microscópio Olympus. As imagens foram capturadas por meio de câmera digital.

- **Análises de Biologia Molecular**

As análises de Biologia Molecular foram realizadas nas seguintes amostras:

- a) Inóculo 1;
- b) Inóculo 3 e;
- c) Inóculo 5.

O processo de extração do DNA foi realizado conforme escrito por Griffiths *et al.* (2000), utilizando-se fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v). O DNA extraído foi quantificado por fluorimetria, misturando-se 2µL de amostra com 1,98µL de tampão e 1µL de fluoróforo. Posteriormente, as amostras foram precipitadas pelo

método de *salting in*, em que se adicionaram 70µL de NaCl e 1ml de etanol absoluto à amostra, centrifugando-a a 13000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após a retirada do sobrenadante, as amostras foram secas em temperatura ambiente por 24 horas em capela e posteriormente armazenadas a -20°C até o seu envio o 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®UltraTMDNA 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 $\geq 97\%$ 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.

- **Quantificação do biogás no headspace dos reatores**

- **Deslocamento de Volume**

A produção de hidrogênio e de metano foi medida por um sistema de deslocamento adaptado de Aquino *et al.* (2007) em todos os ensaios realizados. Neste sistema, os reatores foram acoplados a um sistema de lavagem de gás contendo um frasco com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 15% para o aprisionamento de CO₂ que poderia ser gerado (Equação 10) e, um frasco contendo água destilada. Os reatores foram conectados por meio de “agulha-mangueira” ao frasco da solução de NaOH ocorrendo a automática despressurização do frasco de incubação pelo deslocamento do biogás gerado no *headspace* dos reatores, causando o deslocamento de água do frasco posterior (Figura 9).

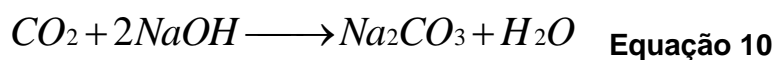


Figura 9 - Sistema de medição volumétrica para quantificação do biogás gerado



FONTE: Adaptado de Aquino et al., 2007.

➤ Cromatográficas

❖ Determinação da composição gasosa do headspace

Foram efetuadas leituras para determinação do gás hidrogênio, metano e CO₂, em reatores pressurizados, por meio da retirada de 30µL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa gastight com trava. Utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna Carboxen 1010 Plot (30 m x 0,53mm), tendo argônio como gás de arraste. As Curvas de Calibração estão no Anexo C.

As condições de cromatográficas foram:

- Temperatura do injetor: 220°C;
- Temperatura da coluna: rampa de temperatura, iniciando com 120°C e finalizando com 230°C, a taxas de 40°C e 50°C;
- Temperatura do detector: 230°C
- Fluxo do gás de arraste: 1,9 ml min⁻¹

❖ Determinação da composição de álcoois e ácidos

Os álcoois e os ácidos graxos voláteis gerados na produção de H₂ foram determinados por cromatografia gasosa (CG) com detector por ionização de chama (GC-FID), conforme descrito por Nespeca *et al.* (2017) em parceria com o CEMPEQC – IQ Unesp – Araraquara - SP. Anteriormente às análises por CG, a biomassa era separada do meio líquido por centrifugação a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C, armazenando-se a fase líquida e superior em freezer a -19°C. Alíquotas de 2 ml das amostras eram transferidas para *via/s* de 22 ml com 1 g de NaCl (para fornecer o efeito “salting out”). Os compostos orgânicos foram mensurados por CG (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 eram 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. A curva de calibração encontra-se no Anexo D.

• Ajuste de dados experimentais

Os dados experimentais de geração de hidrogênio e de metano obtidos durante os ensaios realizados foram ajustados para os valores médios obtidos das triplicatas dos reatores anaeróbios em batelada utilizando o software Statistica® (versão 10). A taxa máxima de produção de hidrogênio e de Metano foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificado (LAY *et al.*, 1998) indicada na Equação 11.

$$H = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Equação 11}$$

Em que P é o potencial de produção de hidrogênio ou de Metano (amplitude da curva sigmoidal) em mmol L⁻¹ cultura, R_m é a taxa máxima de produção de hidrogênio

ou de Metano (mmol L^{-1} cultura. h), λ é o tempo inicial (h) da geração de H_2 ou de CH_4 e e é a constante de Euler (2,718281828).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do glicerol bruto

A origem da matéria prima e as condições empregadas durante a transesterificação influenciam diretamente os parâmetros avaliados na caracterização dos co-produtos gerados na produção do biodiesel. Além disso, a matéria-prima, o tipo e a quantidade de catalisador e a quantidade de álcool adicionado são alguns dos fatores que afetam a composição do glicerol bruto. O glicerol bruto utilizado na presente pesquisa possuía 80,63% de glicerol livre; o restante eram impurezas advindas da reação de transesterificação (Tabela 5). É uma porcentagem relativamente elevada de glicerol livre, provavelmente afetada diretamente pela bi-destilação realizada pela empresa onde o resíduo foi coletado. Tipicamente ele pode conter 50-70% de glicerol livre, 10-20% de metanol, 5-10% de sais, <3-10% de água, <1-5% de ácidos graxos livres e <1-5% de MONG (Matéria Orgânica Não Glicerol) (BOHON *et al.*, 2011).

Tabela 5 - Caracterização do glicerol bruto

Parâmetro	Resultado
DQO	1130,61 g DQO L ⁻¹
Glicerol livre	80,63%
Teor de Sabões	8,01%
Umidade	11,41%
MONG	2,84%
pH	5,3

FONTE: Próprio Autor

Em diversos trabalhos tem sido observado diversas porcentagens de glicerol livre, com valores entre 85% (MU *et al.*, 2006; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA,

2014), 75,5% (ZENG, 1996), 65% (GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005), 45% (MANGAYIL *et al.*, 2012), 23,63% (SARMA *et al.*, 2012), 10,41% (RODRIGUES *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Foi verificada elevada carga orgânica (1130,61 g DQO L⁻¹) no glicerol bruto testado e, portanto, foi necessário diluir este resíduo, a fim de facilitar a sua decomposição e evitar a inibição dos microrganismos. Outro parâmetro importante é o pH, que, no caso do presente estudo era de 5,3, provavelmente ocasionado pela adição de agentes acidificantes, visto que, normalmente, são usados catalisadores básicos na transesterificação (CÉSAR, 2019). Diversas faixas de pH são encontradas na literatura, desde mais ácidos até extremamente alcalinos, tais como 3,4 (SARMA *et al.* 2012), próximo a 7,0 de com (MARU *et al.* 2016), 10,0 (RODRIGUES *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020) ou 12,0 (MANGAYIL *et al.* 2012). Além disso, sabões e metanol são agentes inibidores de crescimento bacteriano (KIVISTÖ, SANTALA e KARP, 2013) e pH mais ácido pode neutralizar o sabão presente no glicerol bruto, diminuindo assim seu teor.

Os sabões são formados em pH neutro a básico, na presença dos catalisadores alcalinos e ácidos graxos livres presentes na matéria-prima, ficando misturados ao glicerol (SEQUINEL, 2013). O sabão é um contaminante na digestão aeróbia, reduzindo a produção de biogás ao inibir a atividade dos microrganismos (KIVISTÖ, SANTALA e KARP 2013). A acidificação do glicerol bruto leva a dissolução do sabão, formando ácidos graxos, como realizado por Sarma *et al.* (2012), eliminando essa impureza. Em relação a concentração de sabão, a porcentagem encontrada neste trabalho foi de 8,01%, mesmo com o pH acidificado. Como a formação de sabão depende da matéria-prima, concentrações variadas são encontradas na literatura, como: 4-5% (CHOOKAEW *et al.*, 2013); 22% (RODRIGUES *et al.*, 2020); 17,7% (SITTIJUNDA e REUNGSANG, 2020).

5.2. Caracterização do esgoto sanitário

O esgoto sanitário possuía carga orgânica reduzida em DQO (Tabela 6) e pode ser utilizado como diluente do glicerol, visto sua composição ser majoritariamente água (~99%). Além disso, os esgotos sanitários contêm outros componentes, como proteínas, gorduras, hidratos de carbono, nitrogênio e fósforo, que favorecem a ação

das bactérias anaeróbias e fermentativas, podendo melhorar a produção de biogás (JORDÃO; PESSOA, 1995).

Tabela 6 - Caracterização do esgoto sanitário

Parâmetro	Resultado
DQO	0,593 g DQO L ⁻¹
pH	6,73±0,2
Temperatura	22,3±1°C
Sólidos Totais	70,2±3 mg L ⁻¹
Nitrogênio	4,02 g L ⁻¹

FONTE: Próprio Autor

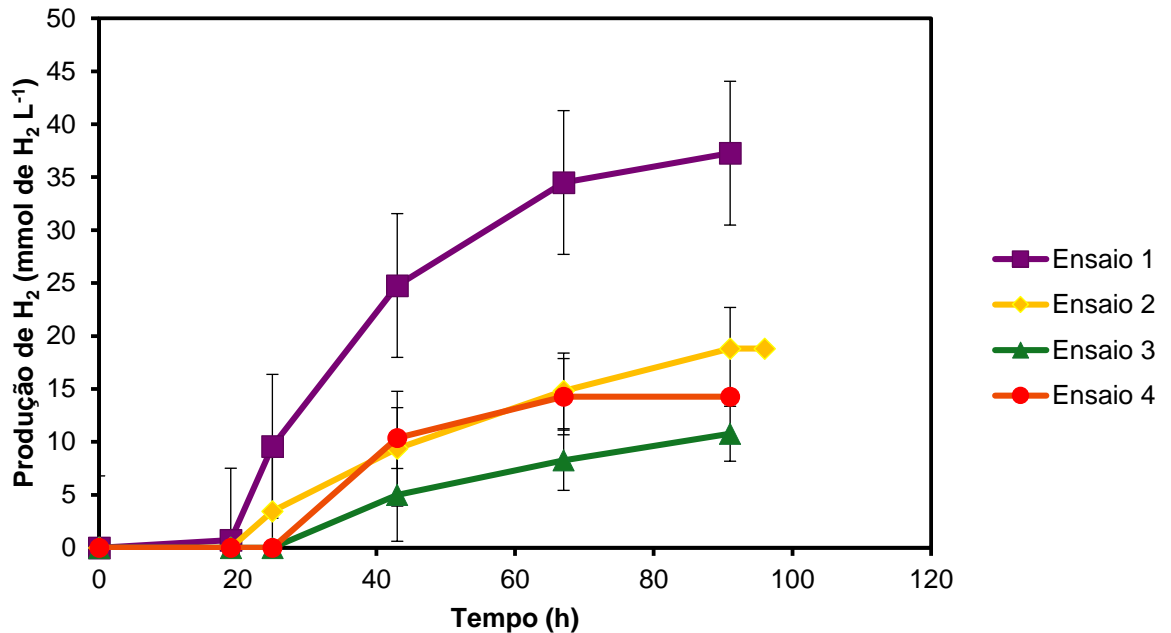
5.3. Ensaio de produção de H₂

5.3.1. Testes preliminares

5.3.1.1. *Comparação da produção de H₂ em reatores anaeróbios em batelada mantidos sob modo estático e agitação, a 55°C*

Os reatores mantidos sob modo estático (ensaio 1 e 2) geraram mais biogás quando comparado aos reatores mantidos sob agitação (ensaio 3 e 4) (Figura 10). Observou-se também que nos reatores operados com o inóculo 1 (ensaio 1) foram produzidos 36,4 mmol H₂ L⁻¹. No entanto, no ensaio 2, em reatores operados com o inóculo 2 foram observadas gerações de hidrogênio mais reduzidas que foram de 19,9 mmol H₂ L⁻¹. Como o ensaio 1 foi realizado a 55°C, era esperado melhores rendimentos para o inóculo 1 (termofílico), quando comparado ao ensaio 2 com o inóculo 2 (mesofílico). Os valores que compuseram a Figura 10 estão no Anexo E.

Figura 10 - Produção temporal de H_2 em reatores anaeróbios em batelada, a $55^\circ C$. Ensaio 1 e 2 operados respectivamente com inóculo 1 e inóculo 2, mantidos sob modo estático. Ensaio 3 e 4 operados respectivamente com inóculo 1 e inóculo 2 mantidos, a 120 rpm

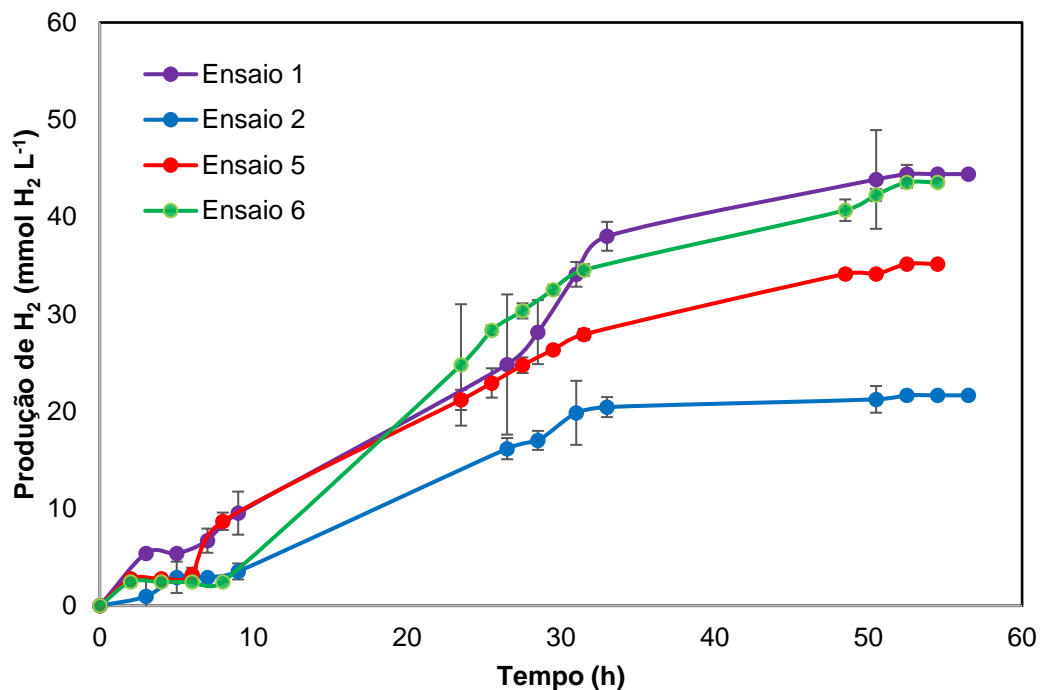


FONTE: Próprio Autor

5.3.1.2. Comparação da produção de H_2 sob diferentes condições termofílicas

Visto que o inóculo 2 (mesofílico) apresentou uma menor produção de H_2 , foi realizado um teste a $45^\circ C$ com ambos os inóculos (1 e 2), mantidos sob modo estático, em meio de cultivo PYG modificado (Tabela 2), por 60 horas. A produção de biogás para os inóculos 1 (Ensaio 5) e 2 (Ensaio 6) foram respectivamente de $35,15 \text{ mmol } H_2 L^{-1}$ e $43,55 \text{ mmol } H_2 L^{-1}$, ambos em 54,5 h de operação (Figura 11). Os valores que compuseram a Figura 8 estão no Anexo E.

Figura 11 - Produção temporal de H₂ dos reatores anaeróbios em batelada operados com inóculo 1 (termofílico) e inóculo 2 (mesofílico) sob diferentes condições termofílicas: ensaios 5 e 6 (45°C) e, ensaios 1 e 2 (55°C)



FONTE: Próprio Autor

Já a 55°C, a produção de biogás para os inóculos 1 (ensaio 1) e 2 (ensaio 2) em 56,5 horas foram de 44,40 mmol L⁻¹ H₂ e 21,64 mmol L⁻¹, respectivamente (Figura 11). O inóculo 1 gerou mais H₂ nesta condição, provavelmente, por tratar-se de lodo termofílico e, portanto, adaptado às temperaturas mais elevadas, quando comparado ao inóculo 2 (mesofílico).

Foi realizado monitoramento do pH em ambas as temperaturas. A 45°C, houve pouca variação, sendo pH inicial 5,50 para ambos os ensaios e pH final 5,56 e 5,69 para os ensaios 5 e 6, respectivamente. Já para os ensaios realizados a 55°C, ocorreu uma maior variação, resultando em valores superiores a 6,0 (Tabela 7). Análises cromatográficas posteriores indicaram a formação de metano conjunta a produção de H₂. Com o consumo de ácidos e álcoois na metanogênese, o pH pode elevar no decorrer do tempo, conforme verificado no teste realizado.

Tabela 7 - Variação do pH nos ensaios 1,2, 5 e 6

	pH Inicial	pH Final	pH Médio
Ensaio 1	5,50±0,05	6,09±0,04	5,87
Ensaio 2	5,50±0,09	6,34±0,06	6,22
Ensaio 5	5,50±0,05	5,56±0,04	5,57
Ensaio 6	5,50±0,02	5,69±0,03	5,70

FONTE: Próprio Autor

A temperatura é um fator muito importante, pois pode afetar a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio ao influenciar a atividade de algumas enzimas essenciais, como a hidrogenase, para a produção fermentativa de H₂. Mas, ao mesmo tempo, determina fortemente o gasto total energético e a intensidade da atividade microbiana na qual a produção de H₂ é dependente (RUGGERI *et al.*, 2015). A maioria das bactérias cresce em faixa limitada de temperatura, sendo desfavorecidas nas temperaturas extremas devido a provável inativação dos sistemas enzimáticos da célula (TORTORA *et al.*, 2012). Como o inóculo 1 era termofílico e, portanto, adaptado a temperatura de 55°C, os melhores resultados foram verificados para essa condição, quando comparado aos ensaios 2 e 6 operados com o inóculo 2 (mesofílico).

Zhang e Shen (2006) mostraram que a capacidade de produção de hidrogênio por uma cultura mista mesofílica, em reatores batelada alimentados com sacarose (25 g L⁻¹) foi fortemente afetada pela temperatura de operação. A elevação da temperatura facilitou a produção de hidrogênio na faixa de 25°C a 40°C, obtendo-se elevadas eficiências de conversão de sacarose (cerca de 98%). Quando a temperatura foi elevada para 45°C, no entanto, a produção de hidrogênio foi fortemente inibida. Akutsu *et al.* (2009) verificaram gerações de hidrogênio com sucesso em condições termofílicas e a produção instável de H₂ foi observada em condições mesofílicas, considerando a utilização de três tipos de inóculo (lodo mesofílico de tratamento de lixo, lodo termofílico de tratamento de resíduos de alimentares e lodo acidogênico termofílico do tratamento de resíduo de batata) na digestão de amido. Fato semelhante foi verificado no presente trabalho onde a temperatura influenciou na produção de H₂, visto que os reatores contendo inóculo termofílico (inóculo 1) produziram mais que o dobro de hidrogênio quando comparado ao inóculo mesofílico (inóculo 2) a 55°C (Figura 8).

Quanto aos consumos de glicerol, os resultados para ambos os inóculos e em ambas as temperaturas foram verificados. A 55°C, 94,6% do glicerol livre foi consumido pelo inóculo 1 (ensaio 1), enquanto 60,8% foi consumido pelo inóculo 2 (ensaio 2), confirmando a influência da temperatura no metabolismo celular (TORTORA *et al.*, 2012), onde o inóculo 2 obteve melhores rendimentos de hidrogênio a faixas termofílicas mais brandas. Os consumos de glicerol nos reatores mantidos a 45°C foram próximos, com reduções de, respectivamente, 92,5% e de 91,3% para o ensaio 5 operado com o inóculo 2 e ensaio 6 operado com o inóculo 1. Contrariamente, o inóculo 1 (termofílico), consumiu quase todo o glicerol disponível em ambas as temperaturas termofílicas testadas.

Pequenas variações de DQO são esperadas em processos fermentativos; uma vez que ácidos e álcoois podem ser gerados e permanecerem no meio líquido. Tal fato também foi verificado nos testes realizados, conforme descrito a seguir. A DQO inicial para ambas as condições era de $27,43 \pm 0,007$ g DQO L⁻¹. A 55°C, nos reatores operados com o inóculo 1 (termofílico), a DQO final foi de $15,14 \pm 0,03$ g DQO L⁻¹, resultando em uma variação de $12,29$ g DQO L⁻¹ (44,8%). Nos reatores operados com o inóculo 2 (mesofílico), a DQO final foi de $17,84 \pm 0,02$ g DQO L⁻¹, com uma variação de $9,59$ g DQO L⁻¹ (35%). Já a 45°C, a DQO final foi de $16,52 \pm 0,02$ g DQO L⁻¹ para os reatores operados com o inóculo 1 (termofílico) e $15,18 \pm 0,02$ g DQO L⁻¹ para os reatores operados com inóculo 2 (mesofílico), portanto a variação foi de $10,91$ g DQO L⁻¹ (39,7%) e $12,25$ g DQO L⁻¹ (44,6%), respectivamente.

De posse dos resultados obtidos para as condições testadas para os inóculo 1 (termofílico) e inóculo 2 (mesofílico), em ambas as temperaturas termofílicas (45°C e 55°C), inferiu-se que os reatores operados com o inóculo 1 (termofílico), mantidos a 55°C e sob modo estático, seria o adequado para uma maior produção de hidrogênio. Nesse sentido, prosseguiu-se a investigação nos demais ensaios em reatores anaeróbios em batelada mantidos a 55°C, sob modo estático, descrito a seguir.

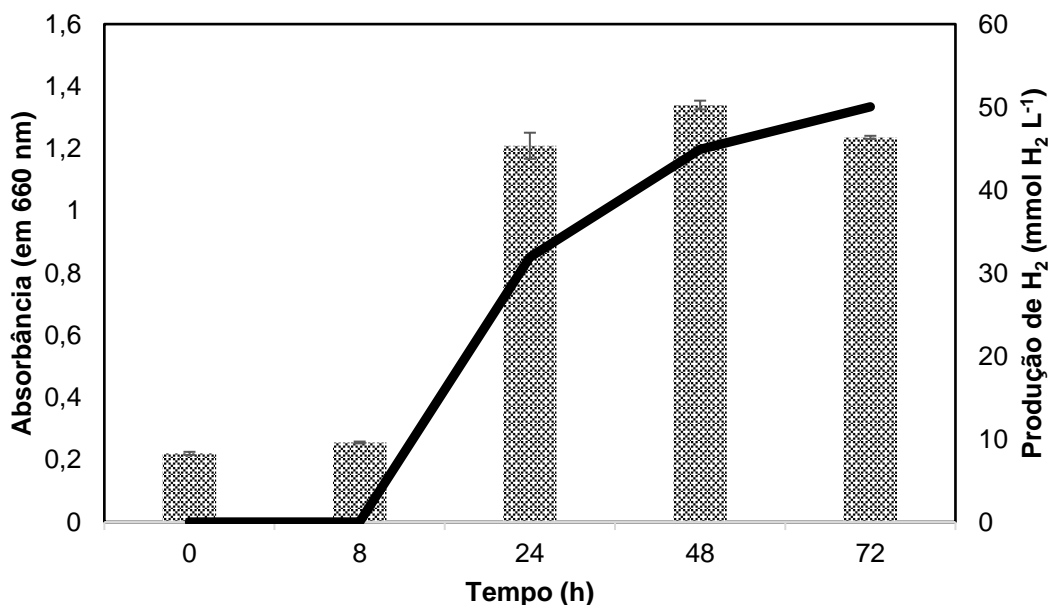
5.4. Obtenção do inóculo 3

Lodos granulares podem apresentar arqueias metanogênicas mesmo após aplicação de tratamentos para sua inativação, o que pode comprometer a geração do hidrogênio produzido. A partir disso, realizou-se o enriquecimento do lodo granular

termofílico pré-tratado (inóculo 1), denominado como inóculo 3, conforme descrito anteriormente, mantido sob condições termofílicas em meios de cultura específicos (Tabela 2 e Tabela 4, descritos anteriormente). Resultados satisfatórios (Ensaio 7) foram obtidos nas reativações realizadas em meio RCM (específico para *Clostridium acetobutylicum*) adaptado do trabalho de KHAMAISEH et al, 2012 (Tabela 4), em aumentos gradativos de volume de reator, conforme descrito anteriormente.

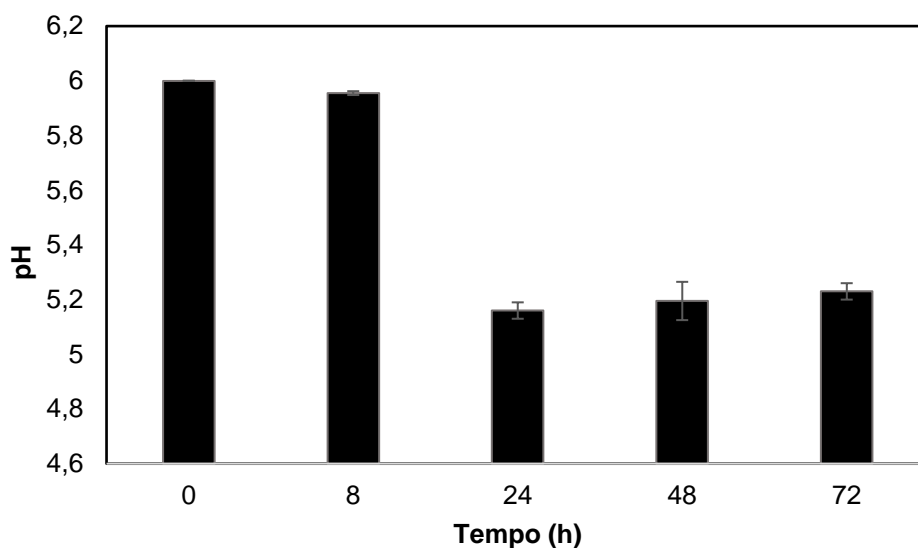
Foi verificado crescimento do inóculo 3 nos reatores, além da geração de hidrogênio (Figura 12). Pode-se observar que o crescimento bacteriano ocorreu após as primeiras 8 horas e o mesmo foi acompanhado pela produção de H₂. O ciclo de crescimento ocorreu em 72 horas. Observou-se comportamento semelhante entre o crescimento e a produção de hidrogênio. Ou seja, à medida que o crescimento bacteriano se estabilizava, a produção de hidrogênio também foi reduzida. O pH também sofreu alteração, diminuindo à medida em que provavelmente foram formados os ácidos e álcoois (Figura 13). Foi produzido um total de 50,03 mmol H₂ L⁻¹ no período deste experimento (72 h). Os valores que compuseram as Figuras 12 e 13 estão no Anexo E.

Figura 12 - Variação temporal do crescimento em reatores anaeróbios em batelada com o inóculo 3 (barras) e geração de hidrogênio (linha)



FONTE: Próprio autor

Figura 13 - Variação temporal do pH durante o crescimento celular em reatores anaeróbios em batelada operados com o inóculo 3



FONTE: Próprio Autor

5.5. Glicerol bruto co-digerido em meio de cultivo

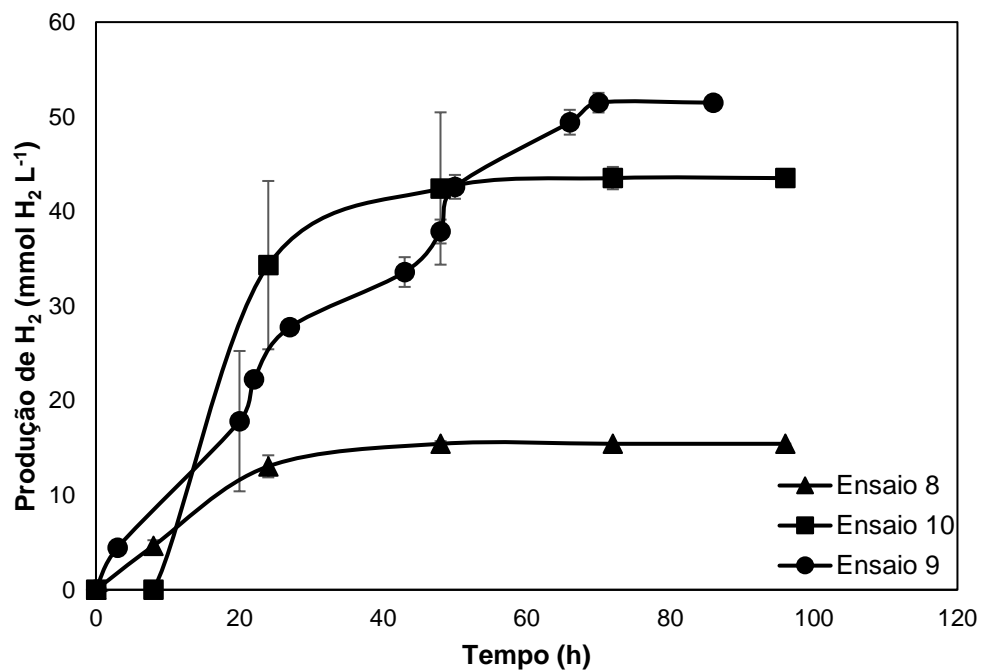
Após a determinação das condições de trabalho e da obtenção do inóculo 3, novos ensaios foram realizados, substituindo-se a glicerina PA pelo glicerol bruto, conforme descrito anteriormente (ensaios 8, 9 e 10). Como o glicerol bruto possuía contaminantes, principalmente metanol e sabões, os ensaios em meio de cultivo foram realizados como uma comparação de produção.

Os testes anteriores com o inóculo 1 (termofílico) foram efetuados com o meio PYG modificado, enquanto o inóculo 3 foi reativado em meio RCM modificado, descritos anteriormente. Portanto, esse ensaio foi feito em dois meios de cultivo (PYG e RCM) com o inóculo 1 (Ensaio 8 e 9, respectivamente). O inóculo 3 foi testado somente em meio de cultivo RCM (Ensaio 10).

Contudo, no início dos ensaios com o inóculo 1 (termofílico), em ambos os meios de cultivo, foi detectada uma mistura de H_2 e CH_4 . Contrariamente, no ensaio 10, testado com o inóculo 3, ocorreu somente a produção de H_2 . Foi verificado que, para o inóculo 3, ocorreu uma seleção de microrganismos geradores de hidrogênio. Já o inóculo 1 (termofílico), originalmente metanogênico, adveio de um reator UASB tratando vinhaça e gerando metano, conforme descrito anteriormente. Provavelmente

o pré-tratamento ácido aplicado não foi eficiente e, no decorrer dos ensaios, com a geração de ácidos e álcoois pelas bactérias fermentativas, os quais são substratos preferenciais para as arqueias, sendo assim favorecidas e interferindo nos resultados. Pela análise cromatográfica dos gases gerados, foram encontradas as produções médias de H₂ para os ensaios 8 e 9, respectivamente: 48,05% e 53,82%. Foram formados respectivamente, 15,43 mmols biogás L⁻¹ (ensaio 8), 51,48 mmols biogás L⁻¹ (ensaio 9) e 43,51 mmols H₂ L⁻¹ (ensaio 10) (Figura 14). Nos ensaios 8 e 9 foram gerados H₂ e CH₄ simultaneamente, enquanto no ensaio 10 foi gerado somente H₂, além de CO₂. Os valores que compuseram as Figuras 14 estão no Anexo E.

Figura 14 - Geração temporal de H₂ em reatores anaeróbios em batelada a alimentados com glicerol bruto em diferentes meios de cultivo.

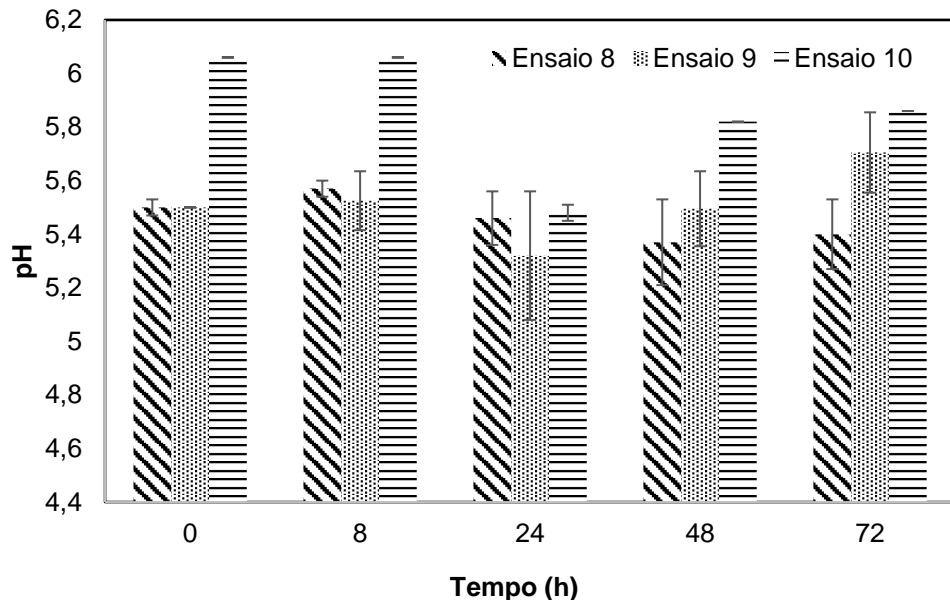


FONTE: Próprio Autor

O pH variou no decorrer do experimento. Para o ensaio 10 (reatores operados com o inóculo 3) foi verificada estabilidade no pH até as 8h, provavelmente devido à adaptação das bactérias às condições nutricionais, resultando também em produção reduzida de hidrogênio. Após 20 horas de operação houve um aumento da produção de H₂ e, conseqüentemente, queda no pH. Já nos ensaios 8 e 9 (reatores operados

com o inóculo 1 - termofílico), o pH teve pouca variação (Figura 15). Os valores que compuseram a Figura 15 estão no Anexo E.

Figura 15 - Variação temporal do pH nos ensaios 8, 9 e 10



FONTE: Próprio autor

A variação de DQO e a remoção de glicerol para os três experimentos estão descritos na Tabela 8. A DQO teve variação reduzida no ensaio 10 (reatores operados com inóculo 3) e no ensaio 9, provavelmente devido a formação de ácidos e álcoois. Também houve consumo reduzido de DQO no ensaio 8 (reatores operados com o inóculo 1 em meio RCM), mesmo com a produção de biometano. Provavelmente, a produção de álcoois e o seu uso pelas metanogênicas foram aproximados.

Vale ressaltar que, apesar de ser adicionado 20 g DQO L⁻¹ de glicerol bruto, os outros componentes do meio de cultivo também possuem matéria orgânica oxidável, o que resultou em valores iniciais mais elevados.

Tabela 8 - Consumo de DQO e de glicerol em reatores anaeróbios em batelada operados com glicerol bruto diluído em meio de cultivo

	Remoção de DQO			Remoção de glicerol		
	Inicial (g DQO L ⁻¹)	Final (g DQO L ⁻¹)	Variação (%)	Inicial (g L ⁻¹)	Final (g L ⁻¹)	Variação (%)
Ensaio 8	30,4±0,09	12,2±0,03	40	3,2±0,00	0,22±0,00	93,0
Ensaio 9	38,9±0,00	34,9±0,01	10	3,4±0,03	0,19±0,01	94,4
Ensaio 10	34,9±0,05	32,6±0,00	6,8	3,3±0,05	0,25±0,01	92,4

FONTE: Próprio autor

5.6. Glicerol bruto co-digerido em esgoto sanitário

A co-digestão em esgoto sanitário visou diluir os contaminantes contidos no glicerol bruto, substituindo a utilização de água, além de possivelmente fornecer outros componentes, como nitrogênio e fósforo, conforme descrito anteriormente. O extrato de levedura e/ou a peptona foram utilizados para garantir a atividade metabólica do consórcio bacteriano ao utilizar o glicerol na produção de H₂, pois esses componentes possuem composição rica em aminoácidos essenciais, fonte de minerais e vitaminas, favorecendo o crescimento de bactérias fermentativas (MAINTINGUER *et al.*, 2008b; ROSSI *et al.*, 2013).

Inicialmente foram realizados experimentos utilizando o inóculo 3, visto que este produzia somente H₂. Foram testadas três combinações de fontes nutricionais: (a) extrato de levedura (ensaio 11); (b) peptona (ensaio 12) e (c) extrato de levedura+peptona (ensaio 13). Esses componentes foram adicionados aos reatores junto com o esgoto sanitário acrescidos de 20 g DQO L⁻¹ de glicerol bruto.

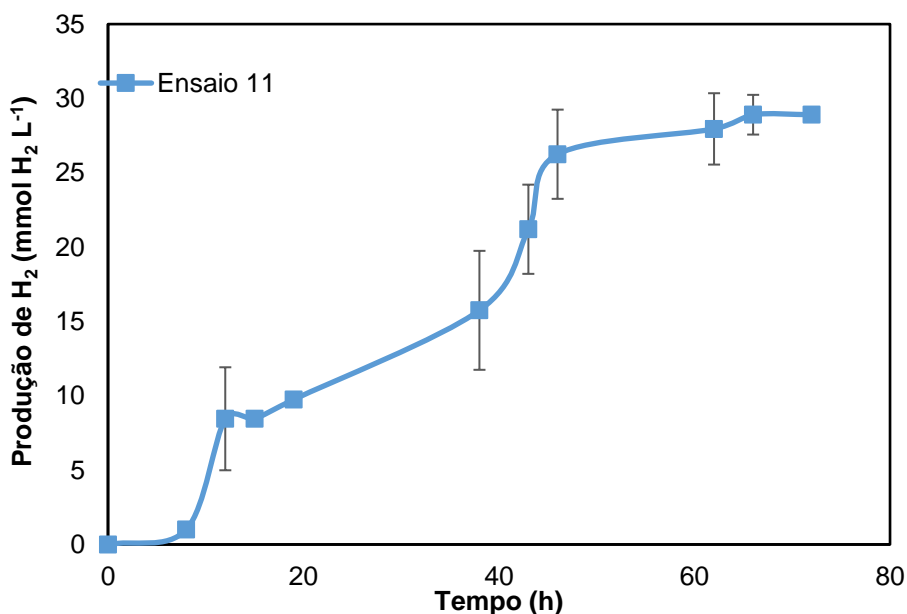
Como o inóculo 1 começou a produzir metano no ensaio com glicerol bruto e meio de cultivo (ensaios 8 e 9) foi realizado tratamento térmico em um lodo granular (inóculo 4), conforme descrito anteriormente. A seguir, os reatores foram montados com glicerol bruto (20 g DQO L⁻¹), esgoto sanitário e extrato de levedura (ensaio 14). Nas análises em cromatografia gasosa somente H₂ e CO₂ foram gerados mostrando que o tratamento térmico foi eficiente na inativação de arqueias geradoras de metano.

Dessa forma, os experimentos foram continuados, a fim de comparar a produção de H_2 nos reatores anaeróbios em batelada operados com o inóculo 3 (ensaios 11, 12 e 13) e com o inóculo 4 (ensaios 14 a 17), separadamente.

❖ Ensaio 11

Os reatores, em triplicata, foram montados com glicerol bruto (20 g DQO L^{-1}), esgoto sanitário, extrato de levedura (5 g L^{-1}) e o inóculo 3. Foram gerados $28,90 \text{ mmols H}_2 \text{ L}^{-1}$ (Figura 16), com consumo de 66,1% do glicerol livre. Os rendimentos foram de $0,69 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. Em relação à DQO, houve um consumo de 17,8%. Relacionando a quantidade de matéria orgânica adicionada com o número de mols de H_2 gerados, obteve-se rendimentos de $0,94 \text{ mmols H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{inicial}}$. Os valores que compuseram a Figura 16 estão no Anexo E.

Figura 16 - Produção acumulada de H_2 no Ensaio 11



FONTE: Próprio autor

Em relação aos ácidos e álcoois formados, observou-se, primeiro, que havia alguns compostos presentes no início do experimento. Como o mesmo inóculo 4 foi utilizado desde o pré-tratamento, sem lavagem com PBS antes da construção dos reatores, poderia ocorrer um arraste dos compostos voláteis entre um ensaio e outro.

No ensaio 11, a geração do co-produto predominante foi etanol (328,06 mg L⁻¹), seguido de ácido butírico (7,3 mg L⁻¹). Os demais metabólitos detectados, tais como os ácidos acético, propiônico e isobutírico estavam presentes no resíduo e, portanto, não foram produzidos durante a operação dos reatores anaeróbios. (Tabela 9, Figura 17).

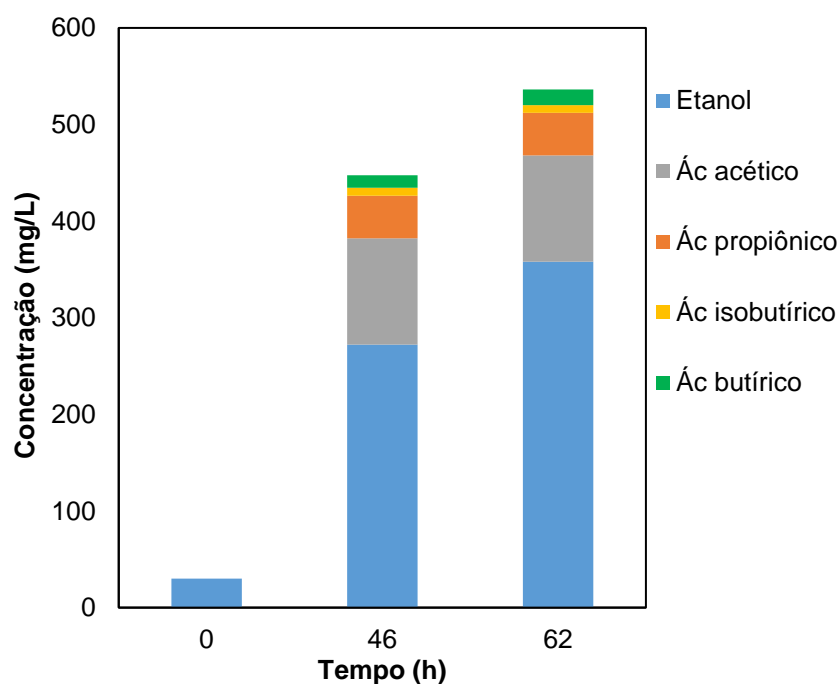
Tabela 9 - Geração de ácidos e álcoois no ensaio 11

Tempo (h)	0	46	62
Etanol (mg L⁻¹)	29,85	272,16	357,91
Ácido Acético (mg L⁻¹)	<l.d.	110,19	110,19
Ácido Propiônico (mg L⁻¹)	<l.d.	43,95	43,95
Ácido Isobutírico (mg L⁻¹)	<l.d.	8,12	8,17
Ácido Butírico (mg L⁻¹)	<l.d.	13,11	16,05

I.d. – limite de detecção do método

FONTE: Próprio autor

Figura 17 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 11

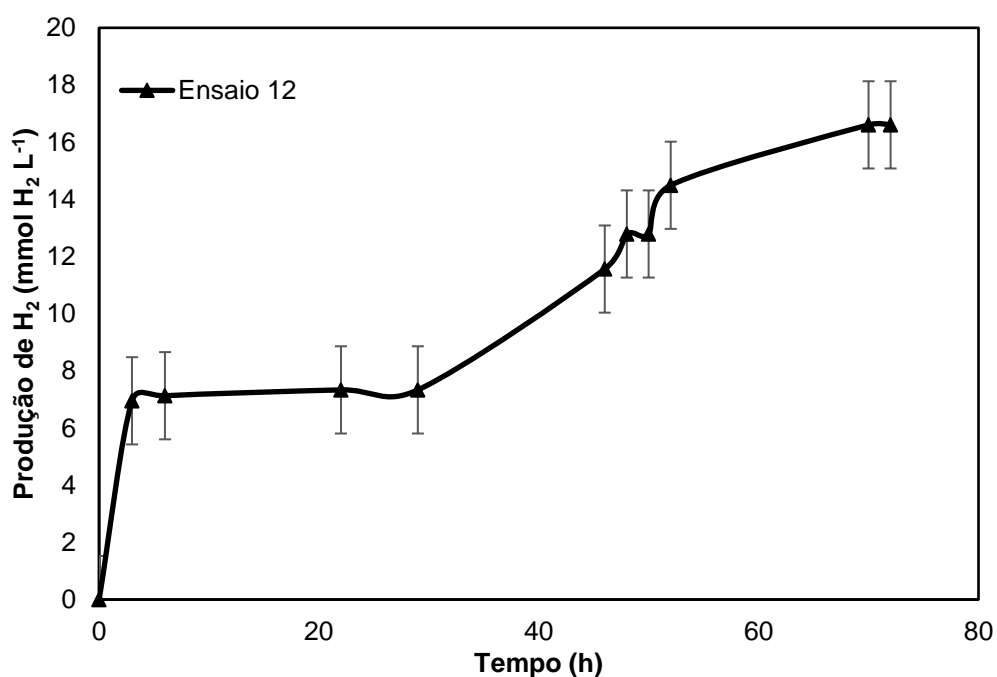


FONTE: Próprio autor

❖ Ensaio 12

Triplicatas de reatores foram montadas com glicerol bruto (20 g DQO L^{-1}), esgoto sanitário, peptona (5 g L^{-1}) e o inóculo 3. Foram gerados $16,60 \text{ mmols H}_2 \text{ L}^{-1}$ (Figura 18), com consumo de 71% do glicerol livre. Os rendimentos foram de $0,37 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. Em relação a DQO, houve um consumo de 6,4%. Relacionando a quantidade de glicerol adicionado (em relação a DQO), com o número de mols de H_2 gerados, obteve-se rendimentos de $0,41 \text{ mmols H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{inicial}}$. Os valores que compuseram a Figura 18 estão no Anexo E.

Figura 18 - Produção acumulada de H_2 no Ensaio 12



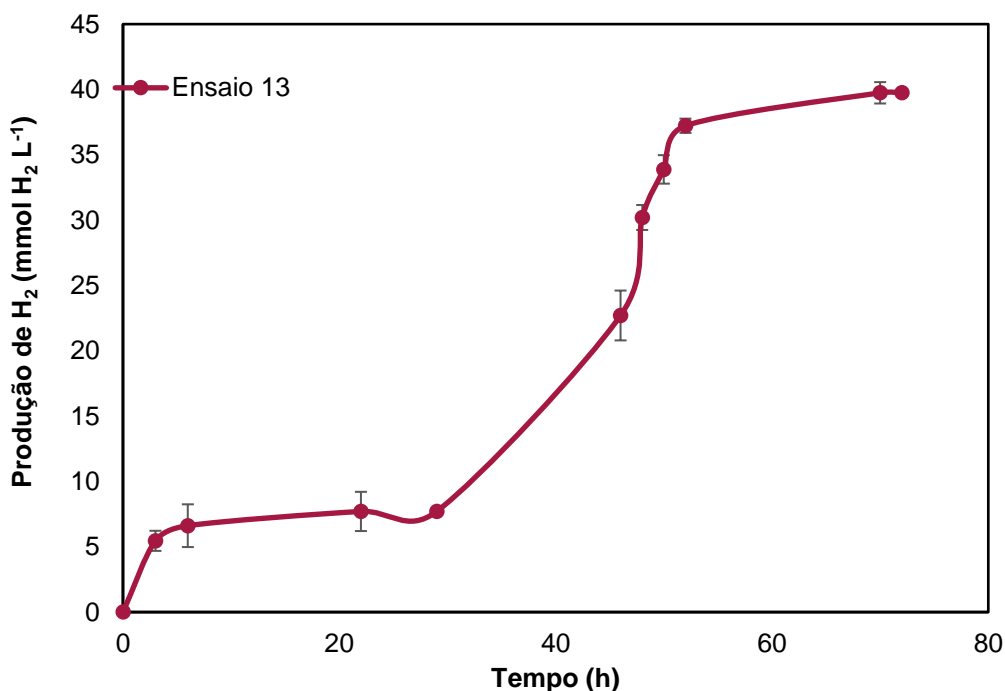
FONTE: Próprio autor

❖ Ensaio 13

Os reatores foram montados com glicerol bruto (20 g DQO L^{-1}), esgoto sanitário, peptona ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) e o inóculo 3. Foram gerados $39,74 \text{ mmols H}_2 \text{ L}^{-1}$ (Figura 19), com consumo de 77% do glicerol livre. Os rendimentos foram de $0,78 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. Em relação a DQO, houve um consumo de 1,1%.

Relacionando a quantidade de glicerol adicionado (em relação a DQO), com o número de mols de H₂ gerados, obteve-se rendimentos de 0,91 mmols H₂ g⁻¹ DQO_{inical}. O pH inicial era de 6,0±0,05 e o pH final foi 6,2±0,08. Os valores que compuseram a Figura 19 estão no Anexo E.

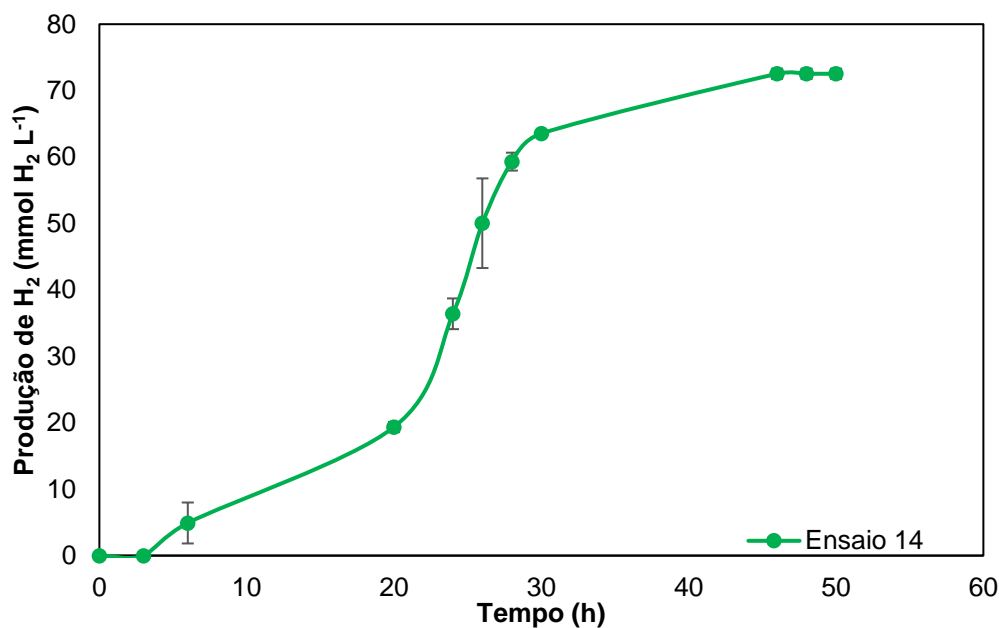
Figura 19 - Produção acumulada de H₂ no Ensaio 13



FONTE: Próprio autor

❖ Ensaio 14

Triplicatas de reatores foram montadas com glicerol bruto (20 g DQO L⁻¹), esgoto sanitário, extrato de levedura (5 g L⁻¹) e o inóculo 4. Foram produzidos 72,53 mmols H₂ L⁻¹ (Figura 20) e 79% do glicerol livre foi consumido, acarretando em rendimentos de 1,37 mols H₂ mol glicerol_{consumido}⁻¹. Em relação DQO, houve um consumo de 13,8%. Relacionando a quantidade de glicerol adicionado (em relação a DQO), com o número de mols de H₂ gerados, obteve-se rendimentos de 2,60 mmols H₂ g⁻¹ DQO_{inical}. O pH inicial era de 5,5±0,0 e o pH final foi 5,89±0,01. Os valores que compuseram a Figura 20 estão no Anexo E.

Figura 20 - Produção acumulada de H₂ no ensaio 14

FONTE: Próprio autor

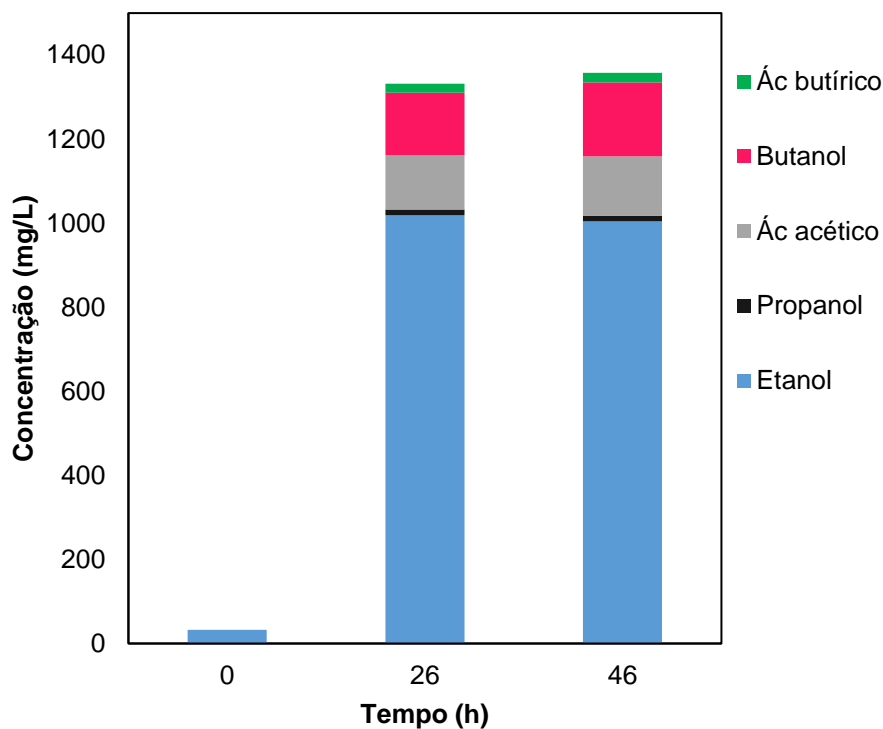
Como no ensaio 11, foram detectados ácidos e álcoois no início do experimento. No ensaio 14, houve uma geração expressiva de etanol, principalmente nas primeiras 30 horas (Tabela 10 e Figura 21); além de propanol (13,66 mg L⁻¹), butanol (175,91 mg L⁻¹) e ácido acético (141,05 mg L⁻¹).

Tabela 10 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois gerados na fermentação para o ensaio 14.

Tempo (h)	0	26	46
Etanol (mg L ⁻¹)	32,52	1018,89	1004,59
Propanol (mg L ⁻¹)	<l.d.	13,66	13,07
Ácido Acético (mg L ⁻¹)	<l.d.	129,50	141,05
Butanol (mg L ⁻¹)	<l.d.	148,66	175,92
Ácido Butírico (mg L ⁻¹)	<l.d.	21,07	23,07

l.d. – limite de detecção do método

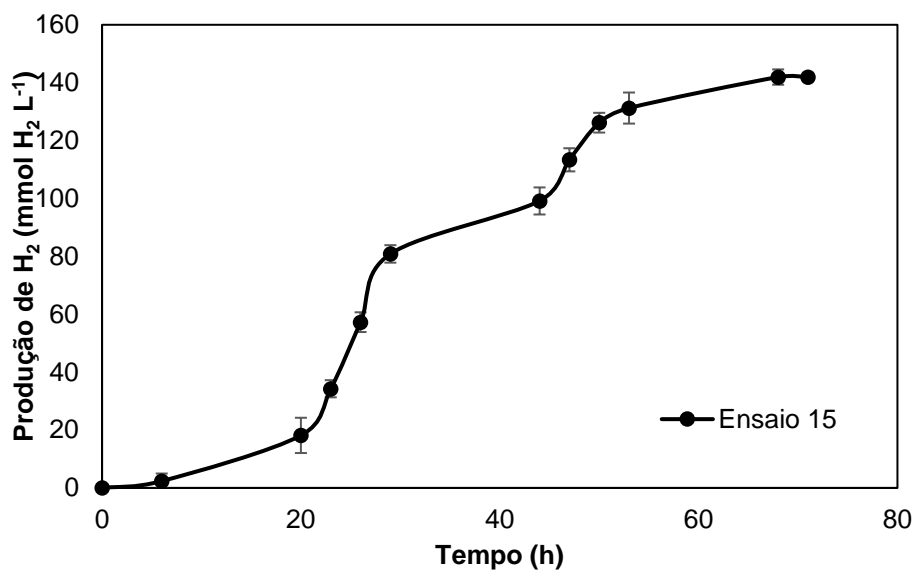
FONTE: Próprio autor

Figura 21 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 14

FONTE: Próprio autor

❖ Ensaio 15

Triplicatas de reatores anaeróbios em batelada foram montados com glicerol bruto (30 g DQO L^{-1}), esgoto sanitário, extrato de levedura (5 g L^{-1}) e o inóculo 4. Foram produzidos $141,94 \text{ mmols H}_2 \text{ L}^{-1}$ (Figura 22) e 90% do glicerol livre foi consumido, acarretando em rendimentos de $1,58 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. Em relação a DQO houve um consumo de 27,9%. Relacionando a quantidade de glicerol adicionado (em relação a DQO), com o número de mols de H_2 gerados, obteve-se rendimentos de $3,87 \text{ mmols H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{inicial}}$. Os valores que compuseram a Figura 22 estão no Anexo E.

Figura 22 - Produção acumulada de H₂ no ensaio 15

FONTE: Próprio autor

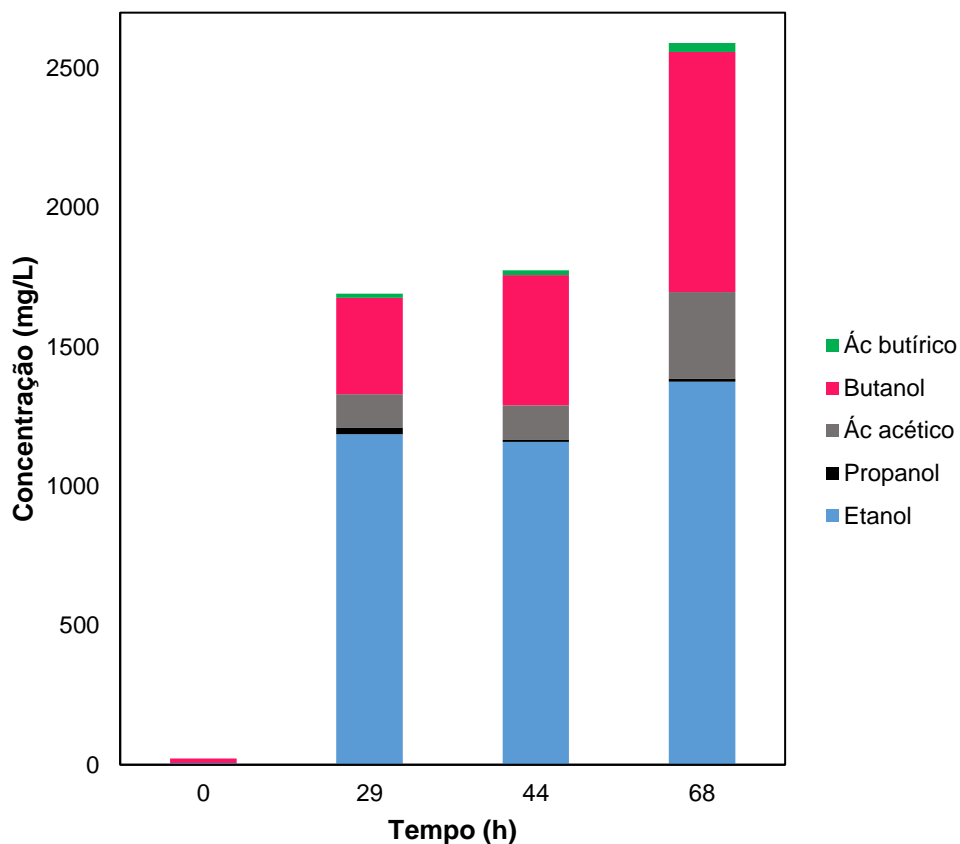
Em relação aos ácidos e álcoois gerados durante a fermentação, ocorreu similarmente aos outros ensaios (11 e 14) a maior produção de etanol (1368,9 mg L⁻¹), principalmente até 29 horas de operação (Tabela 11). Outros álcoois formados, com destaque para o butanol (844,9 mg L⁻¹), principalmente no período de 44 e 68 horas, além de propanol (11,6 mg L⁻¹). Os ácidos acético e butírico também foram gerados, em concentrações máximas de 310,47 mg L⁻¹ e 32,66 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 23).

Tabela 11 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois gerados na fermentação para o ensaio 15

Tempo (h)	0	29	44	68
Etanol (mg L⁻¹)	6,07	1186,66	1159,42	1375,30
Propanol (mg L⁻¹)	<l.d.	24,02	6,78	11,57
Ácido Acético (mg L⁻¹)	<l.d.	119,49	124,23	310,47
Butanol (mg L⁻¹)	16,57	346,01	467,69	861,45
Ácido Butírico (mg L⁻¹)	<l.d.	14,96	16,86	32,66

l.d. – limite de detecção do método

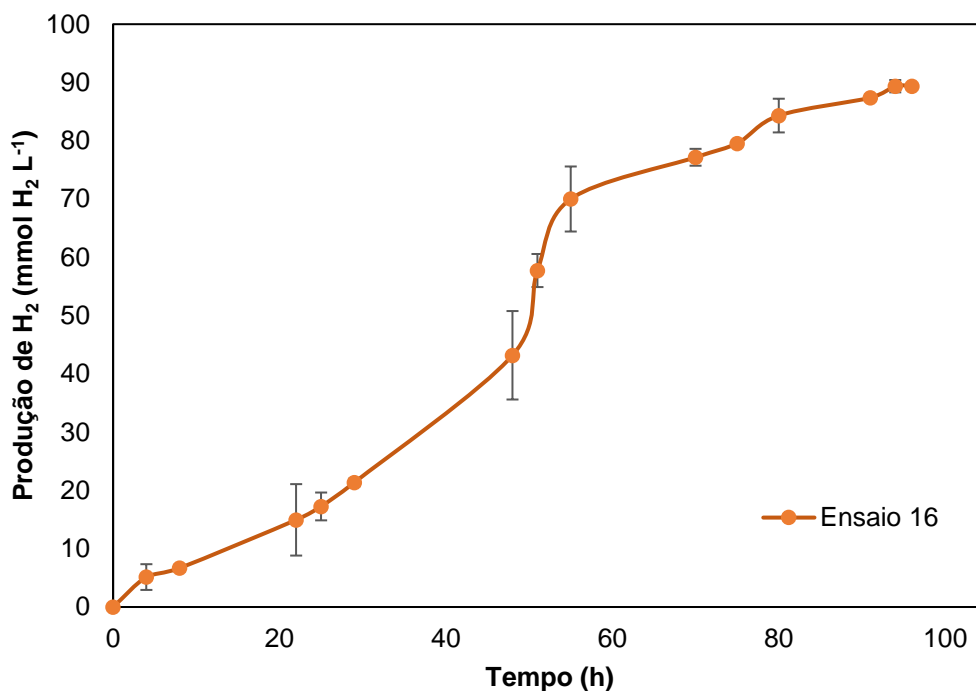
FONTE: Próprio Autor

Figura 23 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 15

FONTE: Próprio autor

❖ Ensaio 16

Os reatores, em triplicata, foram montados com glicerol bruto (40 g DQO L^{-1}), esgoto sanitário, extrato de levedura (5 g L^{-1}) e o inóculo 4. Foram produzidos $89,36 \text{ mmols H}_2 \text{ L}^{-1}$ (Figura 24) e 68% do glicerol livre foi consumido, acarretando em rendimentos de $1,02 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. Em relação DQO, houve um consumo de 2,4%. Relacionando a quantidade de glicerol adicionado (em relação a DQO), com o número de mols de H_2 gerados, obteve-se rendimentos de $2,13 \text{ mmols H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{inicial}}$. O pH inicial era de $5,51 \pm 0,01$ e o pH final foi $5,28 \pm 0,02$. Os valores que compuseram a Figura 24 estão no Anexo E.

Figura 24 - Produção acumulada de H₂ no ensaio 16

FONTE: Próprio autor

Quanto aos ácidos e álcoois, houve produção de butanol entre 22 e 51 horas, porém, até o final do ensaio, o mesmo não foi mais detectado, indicando um possível consumo deste álcool no decorrer da fermentação. Foram produzidos 2308,6 mg L⁻¹ de etanol, 134,4 mg L⁻¹ de ácido butírico, 10,2 mg L⁻¹ de ácido isovalérico, entre outros. Devido ao aumento da concentração de glicerol bruto, aumentou-se a concentração de metanol (um contaminante desse resíduo) no início do experimento sendo 38,6 mg L⁻¹. Porém, no decorrer do ensaio, houve uma diminuição nessa concentração em 22 horas, um aumento em 51 horas e uma nova diminuição em 91 horas (Tabela 12), o que pode indicar um possível consumo do metanol por bactérias fermentativas. A partir das 91 horas, foi detectado 1,3-propanodiol (1,3 PD), o qual indica uma mudança na rota bioquímica da fermentação do glicerol.

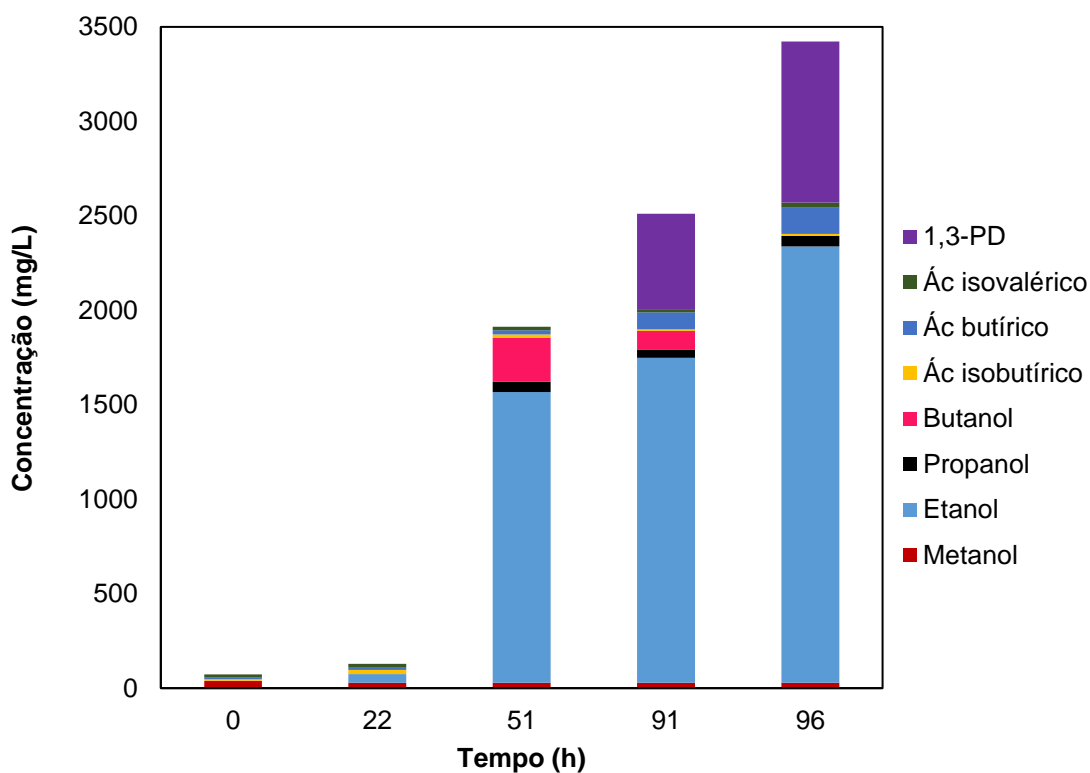
Tabela 12 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois geados na fermentação para o ensaio 16

Tempo (h)	0	22	51	91	96
Metanol (mg L ⁻¹)	38,61	28,41	28,03	27,92	29,23
Etanol (mg L ⁻¹)	<l.d.	45,47	1539,60	1720,10	2308,63
Propanol (mg L ⁻¹)	<l.d.	<l.d.	54,00	45,38	56,55
Butanol (mg L ⁻¹)	<l.d.	<l.d.	234,17	97,90	0,00
Ácido Isobutírico (mg L ⁻¹)	8,26	23,18	16,31	8,32	9,31
Ácido Butírico (mg L ⁻¹)	8,87	15,50	21,31	89,06	140,31
Ácido Isovalérico (mg L ⁻¹)	16,95	16,82	19,71	17,27	27,10
1,3-PD (mg L ⁻¹)	<l.d.	<l.d.	<l.d.	504,48	851,48

I.d. – limite de detecção do método

FONTE: Próprio autor

Figura 25 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 16

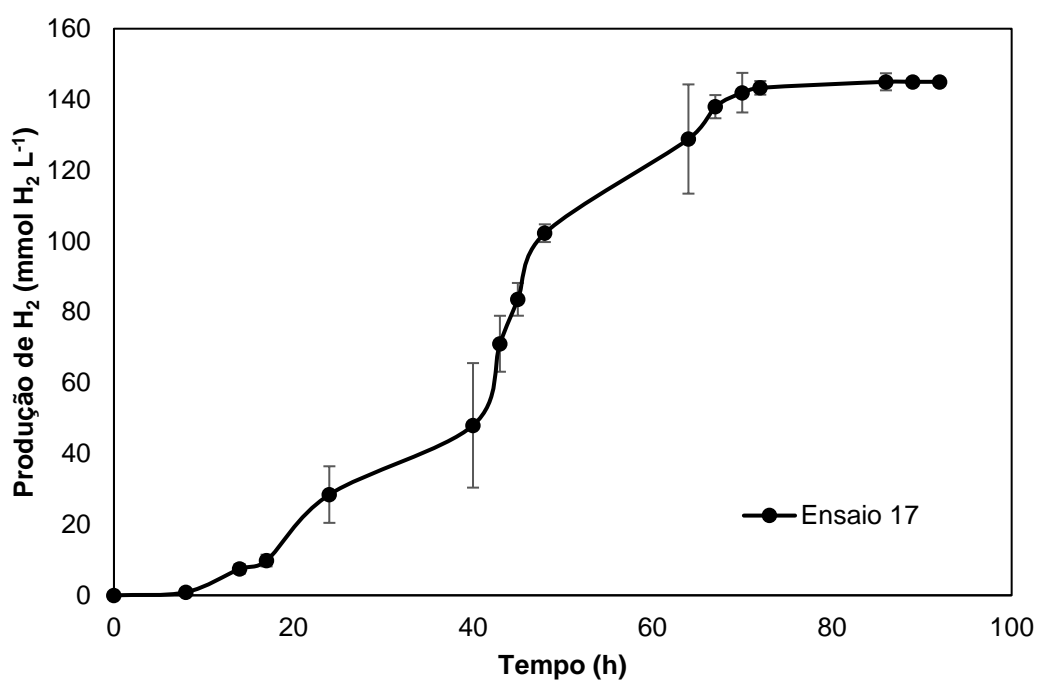


FONTE: Próprio autor

❖ Ensaio 17

Os reatores, em triplicata, foram montados com glicerol bruto (50 g DQO L^{-1}), esgoto sanitário, extrato de levedura (5 g L^{-1}) e o inóculo 4. Foram produzidos $145,0 \text{ mmols H}_2 \text{ L}^{-1}$ (Figura 26) e 80% do glicerol livre foi consumido, acarretando em rendimentos de $1,10 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. Em relação a DQO, houve um consumo de 11%. Relacionando a quantidade de glicerol adicionado (em relação a DQO), com o número de mols de H_2 gerados, obteve-se rendimentos de $2,65 \text{ mmols H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{inicial}}$. O pH inicial era de $5,51 \pm 0,01$ e o pH final foi $5,24 \pm 0,03$. Os valores que compuseram a Figura 26 estão no Anexo E.

Figura 26 - Produção acumulada de H_2 no ensaio 17



FONTE: Próprio Autor

Havia butanol no início do ensaio, entretanto, o mesmo não foi detectado em 86 horas, indicando um possível consumo. Similar aos demais ensaios descritos, houve produção de etanol ($711,3 \text{ mg L}^{-1}$), ácido acético ($14,8 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido butírico ($10,58 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 13). Metanol foi detectado no início do ensaio, provavelmente

proveniente do resíduo, ocorrendo uma diminuição no decorrer da fermentação. A partir das 64 horas, 1,3-PD foi detectado e sua produção aumentou drasticamente em 22 horas, terminando o experimento com 6950,1 mg L⁻¹ (Figura 27), confirmando a mudança da rota metabólica de remoção de glicerol e gerações de 1,3 PD, para concentrações mais elevadas impostas.

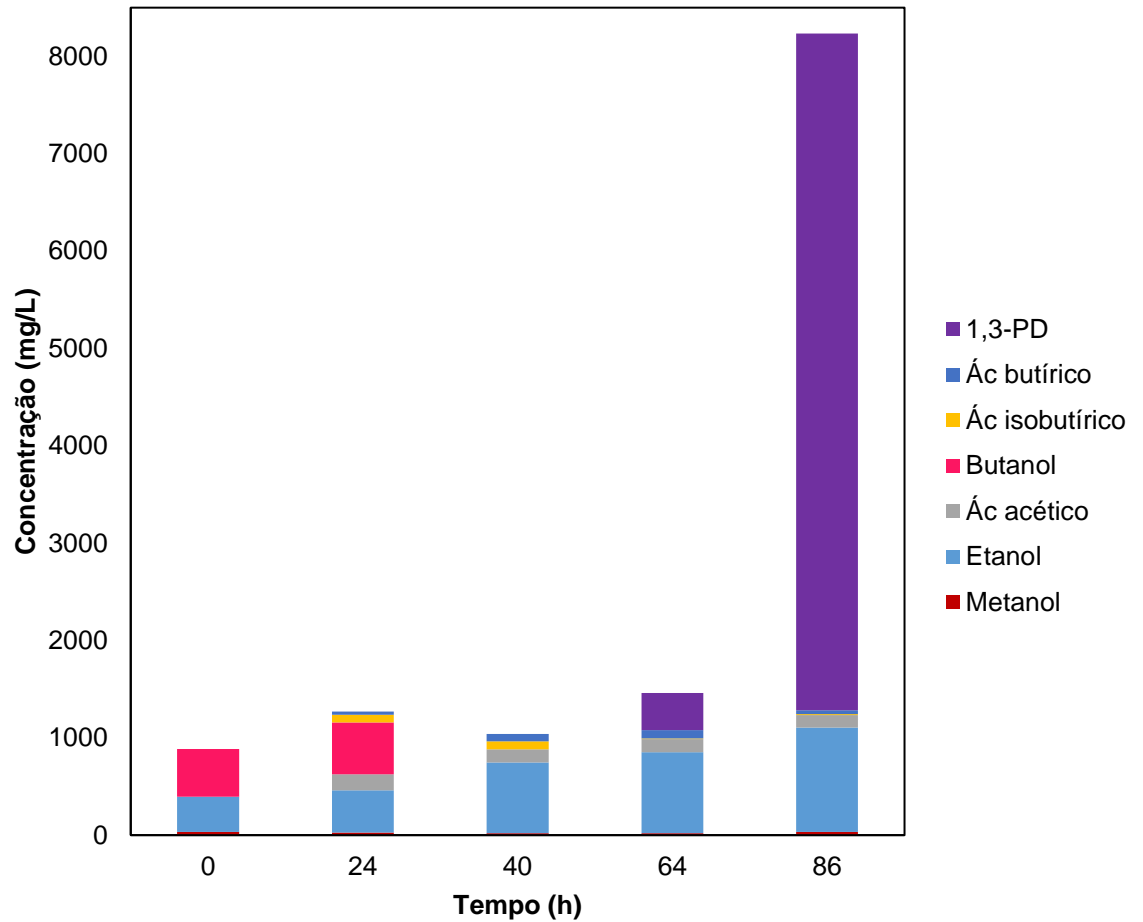
Tabela 13 - Identificação e quantificação dos ácidos e álcoois geados na fermentação para o ensaio 17

Tempo (h)	0	24	40	64	86
Metanol (mg L⁻¹)	32,31	26,66	20,37	18,85	31,47
Etanol (mg L⁻¹)	361,64	434,90	726,41	834,13	1072,90
Ácido Acético (mg L⁻¹)	< l.d.	164,16	133,57	133,38	129,19
Butanol (mg L⁻¹)	490,27	532,13	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Ácido Isobutírico (mg L⁻¹)	< l.d.	78,34	83,56	8,20	8,64
Ácido Butírico (mg L⁻¹)	< l.d.	34,90	73,99	82,72	41,62
1,3-PD (mg L⁻¹)	0,00	0,00	0,00	382,10	6950,12

l.d. – limite de detecção do método

FONTE: Próprio autor

Figura 27 - Distribuição dos ácidos e álcoois presentes no ensaio 17



FONTE: Próprio autor

5.6.1. Comparação dos ensaios geradores de H_2

Foi aplicada a modelagem Gompertz modificada (LAY *et al.*, 1998) para a geração de hidrogênio verificada nos ensaios 11 a 17. Foi verificado que os resultados obtidos se adequaram ao modelo, com valores elevados de R^2 próximos a 0,99 nos ensaios 14, 15, 16 e 17 (Tabela 14).

Tabela 14 - Potencial de Produção de H₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H₂ (R_m), o tempo inicial da geração de H₂ (λ), limites inferior e superior e R² obtidos pela equação de Gompertz modificada

Ensaio	Parâmetros	Valor Estimado	Limite Inferior	Limite Superior	R ²
Ensaio 11	P (mmol L ⁻¹)	32,53	23,18	41,87	0,978
	R _m (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	0,58	0,35	0,80	
	λ (h)	3,36	5,01	11,75	
Ensaio 12	P (mmol L ⁻¹)	30,39	26,70	87,47	0,935
	R _m (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	0,19	0,12	0,26	
	λ (h)	16,23	40,71	8,23	
Ensaio 13	P (mmol L ⁻¹)	44,32	30,32	58,31	0,969
	R _m (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	1,10	0,53	1,68	
	λ (h)	19,73	8,93	30,52	
Ensaio 14	P (mmol L ⁻¹)	73,14	69,72	76,57	0,997
	R _m (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	5,91	4,71	7,11	
	λ (h)	17,09	15,63	18,55	
Ensaio 15	P (mmol L ⁻¹)	144,51	124,73	164,29	0,989
	R _m (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	4,17	2,72	5,62	
	λ (h)	13,52	8,43	18,60	

Continuação da Tabela 14

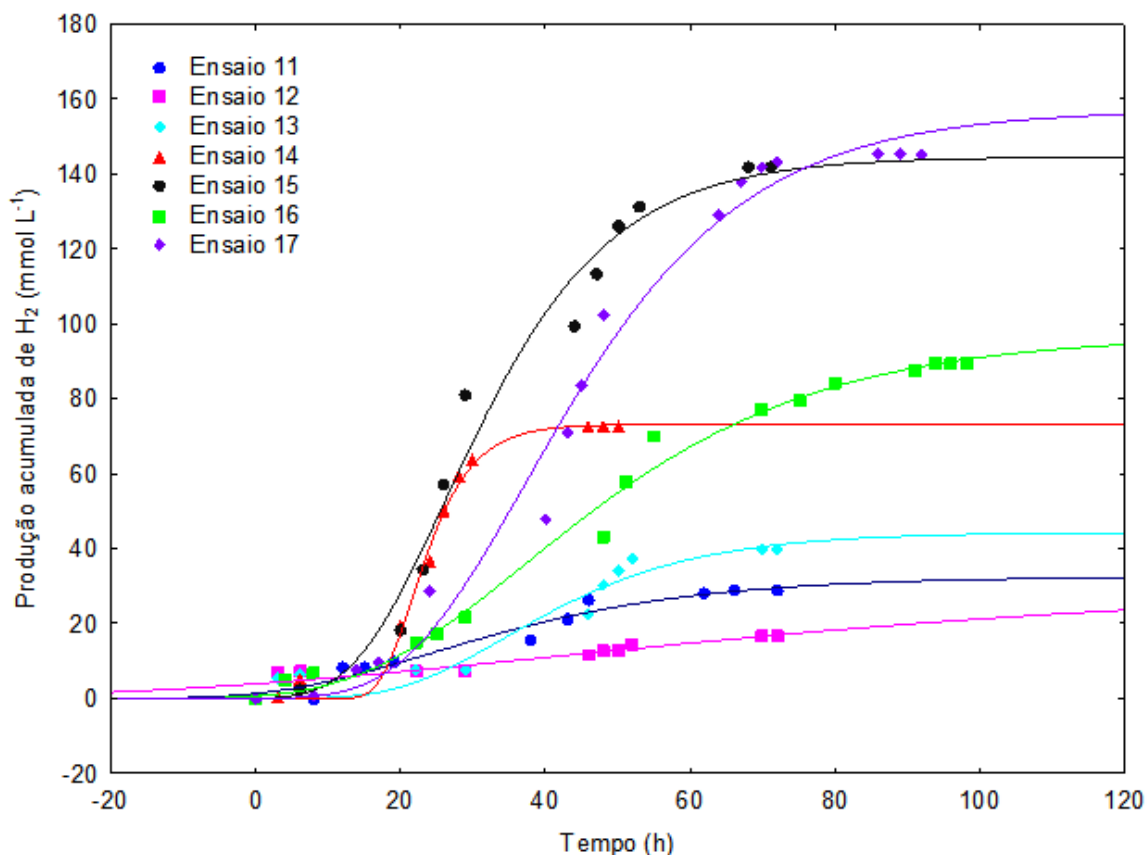
Ensaio 16	P (mmol L ⁻¹)	96,98	88,60	105,36	0,994
	Rm (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	1,56	1,29	1,82	
	λ (h)	14,23	9,50	18,96	
Ensaio 17	P (mmol L ⁻¹)	157,10	142,24	171,96	0,992
	Rm (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	3,39	2,56	4,23	
	λ (h)	20,34	14,61	26,07	

FONTE: Próprio autor

Tal fato sugeriu que a equação de Gompertz modificada foi capaz de descrever a evolução da produção de hidrogênio satisfatoriamente nos casos em que foi utilizado o inóculo 4. Já nos ensaios 11 a 13, realizados com o inóculo 3, tais valores foram inferiores. Visualmente, essa diferença pode ser observada pela distorção na curva característica de produção de H₂ (Figura 28). Outro aspecto que valores de R² indicam é a exatidão e precisão das medições ao longo dos ensaios, os quais são indicados por valores superiores a 0,9, encontrados em todos os ensaios realizados (VARRONE *et al.*, 2013; SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2016).

Outro dado interessante obtido pela equação de Gompertz modificada é a velocidade de geração de biogás, também chamada de taxa máxima de produção de hidrogênio (Rm). Esse parâmetro mostra a quantidade de gás produzida por hora e, quanto mais elevado é o seu valor, mais veloz é a ocorrência da fermentação. A maior velocidade foi verificada no ensaio 14 (5,91 mmol L⁻¹ h⁻¹), o qual possuía 20 g DQO L⁻¹. À medida que concentrações iniciais de glicerol bruto mais elevadas foram impostas (ensaios 15 a 17), a velocidade de geração de hidrogênio diminuiu, mesmo nos casos em que a produção acumulativa de H₂ foi mais elevada, como verificado no ensaio 15 (Tabela 14, Figura 28). Tal fato estabeleceu a concentração ideal de glicerol bruto de 20g DQO L⁻¹ para a geração de H₂, nas condições operacionais impostas.

Figura 28 - Produção acumulada de H₂ de acordo com a equação de Gompertz modificada em reatores anaeróbios alimentados com glicerol bruto



FONTE: Próprio autor

Comparando os ensaios realizados com o inóculo 3 foi possível observar geração mais elevada de H₂ no ensaio 13, o qual possuía extrato de levedura e peptona além do glicerol bruto e do esgoto doméstico. Obteve-se, também, produção de hidrogênio mais reduzidas nos ensaios 11, 12 e 13, quando comparados ao ensaio 10 que foi montado em meio de cultivo PYG com glicerol bruto ao invés de glicerina P.A e gerações de 43,51 mmols H₂ L⁻¹. Nos reatores montados com o inóculo 4, obteve-se uma produção de hidrogênio 2,5 vezes maior no ensaio 14 em relação ao ensaio 11, montados nas mesmas condições (Tabela 15). Como a única diferença entre eles era o inóculo, provavelmente a condição operacional imposta afetou na composição dos consórcios de bactérias anaeróbias geradoras de H₂, presentes em tais ensaios.

Tabela 15 – Principais resultados obtidos nos ensaios 11 a 17 alimentados com Glicerol Bruto e Esgoto sanitário

Análises	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 14	Ensaio 15	Ensaio 16	Ensaio 17
Produção máxima de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	28,94	16,60	39,74	72,53	141,94	89,36	145,0
Tempo de operação dos reatores (h)	72	72	72	54	71	96	92
Glicerol adicionado (gL ⁻¹)	5,83	5,87	6,06	6,27	9,20	11,95	15,11
Remoção de glicerol (%)	66,1	71	77	79	90	68	80
Rendimento mols H ₂ mol glicerol _{consumido} ⁻¹	0,69	0,37	0,78	1,37	1,58	1,02	1,10
DQO Inicial (gL ⁻¹)	30,6	40,3	43,6	27,9	36,4	42,0	54,6
DQO Final (gL ⁻¹)	25,2	37,4	43,2	24,1	26,2	41,0	48,6
Rendimento mmol H ₂ g ⁻¹ DQO	0,94	0,41	0,91	2,60	3,87	2,13	2,65
pH Inicial	6,0	6,0	6,0	5,5	5,5	5,51	5,51
pH Final	5,9	5,9	6,2	5,89	5,63	5,28	5,24
Etanol (mgL ⁻¹)	328,06	< l.d.	< l.d.	1004,59	1368,9	2308,6	711,30
Ácido acético (mgL ⁻¹)	< l.d.	< l.d.	< l.d.	141,05	193,30	< l.d.	14,80
Butanol (mgL ⁻¹)	< l.d.	< l.d.	< l.d.	175,91	844,90	< l.d.	< l.d.
Ácido butírico (mgL ⁻¹)	7,3	< l.d.	< l.d.	14,69	23,7	131,4	10,80
Propanol (mgL ⁻¹)	< l.d.	< l.d.	< l.d.	13,07	11,06	56,5	< l.d.
1,3-PD (mgL ⁻¹)	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	851,8	6950,10

l.d. – limite de detecção do método

FONTE: Próprio autor

Em relação aos ensaios 14 a 17, montados com o inoculo 4, observou-se que, ao se elevar a matéria orgânica disponível, ocorreu um aumento na produção de hidrogênio entre os ensaios 14 e 15. Ao passar de 30 DQO L⁻¹ (ensaio 15) para 40 DQO L⁻¹ (ensaio 16) ocorreu uma queda de produção. Porém, com 50 DQO L⁻¹ (ensaio 16) aconteceu novamente um acréscimo.

Já foram identificados diversos possíveis inibidores para a produção de hidrogênio via fermentação. Alguns exemplos disponíveis na literatura são diferenças na composição dos consórcios anaeróbios, quando há microrganismos consumidores de hidrogênio; a presença de elevadas concentrações de metais como sódio, magnésio e cálcio; derivados de furanos e compostos fenólicos; concentração de amônia; pressão parcial de hidrogênio e a concentração de metabólitos solúveis. (BUNDHOO e MOHEE, 2016). Como houve uma queda na produção de hidrogênio somente no ensaio 16, provavelmente uma possível explicação para redução essa redução tenha sido pela variabilidade nas concentrações dos metabólitos solúveis, principalmente as produções elevadas de etanol e ácido butírico, além de gerações de propanol e butanol quando comparado com os outros ensaios nas mesmas condições operacionais impostas.

Durante a acidogênese, os ácidos orgânicos são produzidos como subprodutos do processo de fermentação e resultam em uma diminuição do pH externo da célula. Esses ácidos podem estar em formas dissociadas ou não; ambos têm efeitos inibitórios na produção de hidrogênio. Os ácidos dissociados aumentam a força iônica do meio e isso impacta a produção de H₂ devido à lise celular, resultando na mudança da acidogênese para a solvatogênese. Já os ácidos indissociados (ou não dissociados) são capazes de penetrar na membrana celular e então se dissociar devido ao maior pH intracelular, resultando em concentrações crescentes de H⁺. O influxo de prótons no citoplasma da célula cria um desequilíbrio do pH intracelular que pode afetar as atividades metabólicas, causando a morte celular e suprimindo a produção de hidrogênio. Para manter um gradiente transmembrana de pH constante, os prótons são forçados para fora do citoplasma da célula por meio de um sistema alimentado por trifosfato de adenosina (ATP) e energia (na forma de ATP celular) é, portanto, consumida. O consumo de ATP resulta em um menor nível de energia disponível que pode acarretar a supressão do crescimento celular bacteriano (BUNDHOO e MOHEE, 2016).

Em concentrações elevadas de ácidos indissociados (ou não dissociados), o nível de ATP e o potencial de extrusão de prótons da célula é consideravelmente reduzido, na tentativa de minimizar a mudança no gradiente de pH transmembrana mais elevado. Conseqüentemente, a energia disponível para a manutenção da célula é reduzida, resultando em uma diminuição no pH intracelular e inibição do crescimento bacteriano, após a formação de ácidos indissociados. Além disso, a mudança na relação ATP/ADP pode desencadear a gênese do solvente, o que leva à formação desse a partir dos ácidos presentes, saindo da acidogênese para a solvatogênese. Isso já foi relatado como um mecanismo de desintoxicação iniciado pela célula contra os efeitos inibitórios dos ácidos orgânicos (BUNDHOO e MOHEE, 2016).

No entanto, solventes como o butanol também podem inibir a capacidade das células de manter o pH interno, reduzir os níveis de ATP e diminuir a captação de glicose. Além disso, os solventes podem “danificar e desnaturar moléculas biológicas”, alterar a capacidade funcional das membranas celulares e causar a morte celular. A presença de etanol também foi relatada como suprimindo o crescimento celular, a formação de biomassa e a produção de hidrogênio (BUNDHOO e MOHEE, 2016), o que foi verificado nos experimentos realizados, pois a geração de etanol no ensaio 16 foi 59,3% (ou 1,7 vezes) superior ao ensaio 15.

Van Ginkel e Logan (2005) estudaram os efeitos inibitórios dos ácidos acético e butírico na fermentação da glicose pela adição desses ácidos na alimentação de reatores de fluxo contínuo (ácidos externos) ou pelo aumento das concentrações de glicose para elevar as concentrações de ácidos produzidos pelas bactérias (autoprodução). Uma concentração total de ácido não dissociado de 19 mM (ácidos autoproduzidos) foi considerada uma concentração limite para diminuir significativamente os rendimentos de H₂ e iniciar a gênese do solvente. A produção de hidrogênio foi inibida mais por ácidos autoproduzidos (produzidos em altas concentrações de glicose na alimentação) do que por concentrações semelhantes de ácidos adicionados externamente (menores concentrações de glicose na alimentação). Tal fato provavelmente pode ter ocorrido no presente estudo, no ensaio 16, conforme descrito a seguir.

Uma possível explicação para o ensaio 16 foi que, ao se adicionar concentrações elevadas de glicerol bruto (40g DQO L⁻¹), as bactérias fermentativas tenham começado a consumi-los, gerando uma elevada produção de ácidos em 29

horas, pois houve uma acentuada queda do pH (de 6,23 em 22 horas para 4,95 em 29 horas). Infelizmente, não foi realizado a quantificação de ácidos e álcoois neste ponto. Porém, em 51 horas, o pH já estava em 5,56 e ocorreu uma produção de 1494 mg L⁻¹ de etanol neste período, além de butanol e propanol em maiores quantidades quando comparados com a produção de outros ácidos. Ou seja, nesse caso foi verificada a mudança de processo de acidogênese para a solvatogênese, como descrito anteriormente. Possivelmente, houve uma seleção da microbiota no inóculo 4, pois, ao passar do ensaio 16 para o ensaio 17, que continha 50g DQO L⁻¹ de glicerol bruto, a produção de hidrogênio foi elevada. Um fato experimental interessante é que, no ensaio 17, houve pouca variação de pH e a produção de ácidos e álcoois, principalmente etanol, foi bem inferior ao ensaio 16, justificando a mudança da rota metabólica etanólica para a geração de hidrogênio.

Em relação ao rendimento, observou-se que, com exceção do ensaio 11, o qual foi montado com o inóculo 3, diferente dos ensaios 14 a 17, valores superiores a 1,0 mol H₂.mol⁻¹ glicerol consumido (Tabela 16). No ensaio 15, montado com 30 DQO L⁻¹ foram obtidos os melhores rendimentos, de 1,58 mols H₂.mol⁻¹ glicerol consumido. A razão entre o número de mols de H₂ produzido em função da do glicerol bruto adicionado, não foi diretamente proporcional, visto que diferentes concentrações de álcoois e ácidos são produzidas em em função das concentrações adicionadas de glicerol bruto, não ocorrendo muito consumo em relação ao início da operação dos reatores (Tabela 15). Um motivo para a menor geração de H₂ em cargas orgânicas mais elevadas foi a produção de 1,3-propanodiol, o qual é resultado de uma mudança na rota bioquímica do glicerol, passando da via oxidativa para a via redutiva.

O tempo de operação dos reatores foram iguais somente para os ensaios realizados com o inóculo 3 (ensaios 11 a 13). Os demais, realizados com o inóculo 4, possuíam concentrações crescentes de glicerol bruto, aumentando o tempo necessário para a fermentação. Em relação ao consumo do glicerol livre, no ensaio 15 foram verificados os consumos mais elevados que foram de 90% das suas concentrações iniciais. Já o consumo de DQO foi relativamente pequeno em todos os ensaios, devido a geração de ácidos e álcoois pelas bactérias fermentativas.

Em relação aos álcoois, etanol foi gerado nos ensaios 11, 14, 15, 16 e 17, com uma quantidade mais elevada no ensaio 15 (2308,6 mgL⁻¹ de etanol) (Tabela 15). Propanol foi gerado nos ensaios 14, 15 e 16. Butanol foi gerado nos ensaios 14 e 15.

Já o ácido acético foi gerado nos ensaios 14, 15 e 16 e o ácido butírico foi encontrado em todos os ensaios analisados (11, 14, 15, 16 e 17). A partir do ensaio 16, o qual possuía 40g DQOL^{-1} , observou-se a produção de 1,3-PD, que também foi produzido no ensaio 17, em maior quantidade ($6950,10\text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 15). A produção de 1,3-PD indica mudança na rota de decomposição do glicerol, pois esse ácido é gerado na rota redutiva, ao contrário dos outros compostos voláteis, os quais são gerados na rota oxidativa, conforme descrito anteriormente. Uma característica interessante a ser observada é a elevada produção de H_2 mesmo com a produção significativa de 1,3-PD, pois, na geração de 1,3-PD não é produzido H_2 . Ou seja, ambas as rotas metabólicas oxidativa e redutiva foram verificadas, confirmando mais uma vez vantagens na operação sob condições termofílicas, em concentrações mais elevadas de glicerol.

5.6.2. Comparação dos resultados obtidos com a Literatura

Os resultados obtidos no presente estudo foram promissores e, em muitos casos, superiores na geração de hidrogênio e de mais metabolitos de valor agregado a partir dos consumos de glicerol bruto sob condições termofílicas, conforme descrito a seguir.

Sittijunda e Reungsang (2012) analisaram como as composições dos meios de cultivo afetavam a produção termofílica (55°C) de bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto através de otimização, usando a metodologia de superfície de resposta com desenho de composto central. Foi realizado um ensaio, em triplicata de reatores anaeróbios em batelada, o qual gerou $1502,84\text{ ml H}_2\text{ L}^{-1}$ ($61,35\text{ mmols H}_2\text{ L}^{-1}$) e rendimentos de $0,3\text{ mols H}_2\text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. A concentração de glicerol bruto utilizada foi $20,33\text{ gL}^{-1}$, com cultura mista termofílica. Comparando esses resultados com o ensaio 14 ($73,53\text{ mmols H}_2\text{ L}^{-1}$) foram verificadas produções acumuladas de H_2 , assim como os rendimentos superiores ($1,37\text{ mols H}_2\text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$). Há diferenças significativas entre este trabalho e o realizado pelos autores, como a fonte de glicerol bruto. Outra vantagem foi que no presente trabalho foram verificadas produções mais elevadas de H_2 sem a adição de diversos aditivos, além da utilização de esgoto sanitário em substituição à água potável (Tabela 16).

Chookaew, O-thong e Prasertsan (2014) investigaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto por bactéria termotolerante *Klebsiella* sp. TR17, através de otimização em desenho de composto central, determinando a concentração de glicerol bruto, KH_2PO_4 e NH_4Cl . A validação das condições ótimas, a qual continha $11,14 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol bruto, exibiu um rendimento semelhante de hidrogênio de $0,26 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$. Os experimentos foram realizados a 40°C . Na maioria dos ensaios realizados no presente estudo, com glicerol bruto, foram verificados rendimentos superiores de H_2 por mol de glicerol consumido, a partir de concentrações mais elevadas de glicerol bruto ($22,43$ e $33,7 \text{ g L}^{-1}$) que foram de $1,37 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$ e $1,58 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$, respectivamente (Tabela 16).

Rodrigues *et al.* (2020a) estudaram a produção de H_2 em um biosistema integrado. Na fase de fermentação, 20g DQO L^{-1} glicerol bruto oriundo de óleo de cozinha usado foi misturado a extrato de levedura, extrato de carne, peptona e cultura mista, em reatores de 1L , com volume de trabalho de 650ml . Os experimentos, em duplicata, foram realizados com $\text{pH } 5,5$ e a 37°C . Os autores obtiveram $22,38 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ em $84,4$ horas, com consumos de glicerol em $45,74\%$, gerações de etanol ($864,3 \text{ gL}^{-1}$), ácido acético ($534,5 \text{ gL}^{-1}$) e ácido butírico ($483,7 \text{ gL}^{-1}$, com rendimentos de $1,75 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$. No ensaio 14 do presente estudo, realizado com cultura mista, $\text{pH } 5,5$, e com glicerol bruto (20g DQO L^{-1}) co-digerido somente em esgoto sanitário e extrato de levedura, a 55°C , foram verificadas produções mais elevadas e de $72,53 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ em 54 horas, com rendimentos de $1,37 \text{ mols H}_2 \text{ mol glicerol}_{\text{consumido}}^{-1}$ (Tabela 16).

Sittyunda e Reungsang (2020) investigaram a produção simultânea de hidrogênio, etanol e 1,3-PD a partir do glicerol puro e do glicerol bruto em condições termofílicas ($55 \pm 4^\circ\text{C}$), em reator UASB. Nos ensaios com glicerol bruto foram realizados ensaios com taxas de carregamento orgânico de $50 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$, $62,5 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ e $75 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$, com produção mais elevada de H_2 em taxas de carregamento mais altas que foram respectivamente de (mmol L^{-1}): $156,51$; $457,52$ e $338,92$. O presente estudo obteve produções de $72,53 \text{ mmol L}^{-1}$ e $141,94 \text{ mmol L}^{-1}$, em reatores em batelada, contendo 20 g DQO L^{-1} e 30 g DQO L^{-1} , respectivamente, ambientados a 55°C (Tabela 16).

Rodrigues *et al.* (2020b) analisou a produção de H₂ pela fermentação de glicerol bruto oriundo da transesterificação de óleo de cozinha usado, com 20 e 40 g DQO L⁻¹, com rendimentos mais elevados e de respectivamente 3,01 e 2,45 mols H₂ mol glicerol⁻¹, em reatores mantidos a 37°C com cultura mista enriquecida) que o presente estudo (1,37 e 1,02 mols H₂ mol glicerol⁻¹, nas mesmas concentrações de DQO, a 55°C e lodo granular termofílico). Os autores (op.cit.) obtiveram maior quantidade ácido butírico, enquanto etanol foi o subproduto majoritário no presente estudo. Estequiometricamente, 2 mols de glicerol geram quatro mols de hidrogênio para cada mol de ácido butírico formado (Equação 4), enquanto a produção de etanol consome um mol de glicerol (Equação 5), gerando um mol de hidrogênio. Os autores obtiveram produções de 1,3-PD com 20 e 40 g DQO L⁻¹ de glicerol bruto, que foram respectivamente de 30,55 mgL⁻¹ e 30,46 mgL⁻¹. No presente estudo, foram verificados resultados mais elevados de 1,3 PD [851,48 mgL⁻¹(ensaio 16) e 6950,10 mgL⁻¹ (ensaio 17)] em condições termofílicas, além da geração de etanol, que não foi obtido pelos autores (op.cit) (Tabela 16).

Paranhos e Silva (2020) realizaram a otimização estatística da produção de H₂, 1,3-PD e ácido propiônico a partir do glicerol bruto em um reator AFBR (Anaerobic Fluidized Bed Reactor, reator anaeróbio de leito fluidizado) em condições mesofílicas (30°C). Foram realizados 10 ensaios, variando a concentração de glicerol afluyente e tempo de retenção hidráulica (TRH). A remoção mais elevada de glicerol (98,4%) foi obtida com a adição de 2,9 gL⁻¹ de glicerol em um TRH de 5 h; entretanto, H₂ não foi produzido nessa condição. Por outro lado, o maior rendimento (0,30 mol H₂ kg DQO_{aplicado}⁻¹ e 0,17 mol H₂ mol glicerol_{consumido}⁻¹) foi observado na concentração de 17,1 gL⁻¹ de glicerol, ocorrendo o menor consumo de substrato (20,2%). No experimento de confirmação, os autores (op. cit) utilizaram 12,7 gL⁻¹ de glicerol, com rendimentos de 0,23 mol H₂ kg DQO_{aplicado}⁻¹. No presente estudo, a menor concentração analisada foi 20g DQO L⁻¹ (6,27 gL⁻¹ de glicerol adicionado), com rendimentos superiores e de 1,37 mol H₂ mol glicerol_{consumido}⁻¹ e 0,77 mol H₂ kg DQO_{aplicado}⁻¹ (Tabela 16).

Tabela 16 - Comparação na geração de H₂ e metabólitos a partir de Glicerol bruto com a literatura

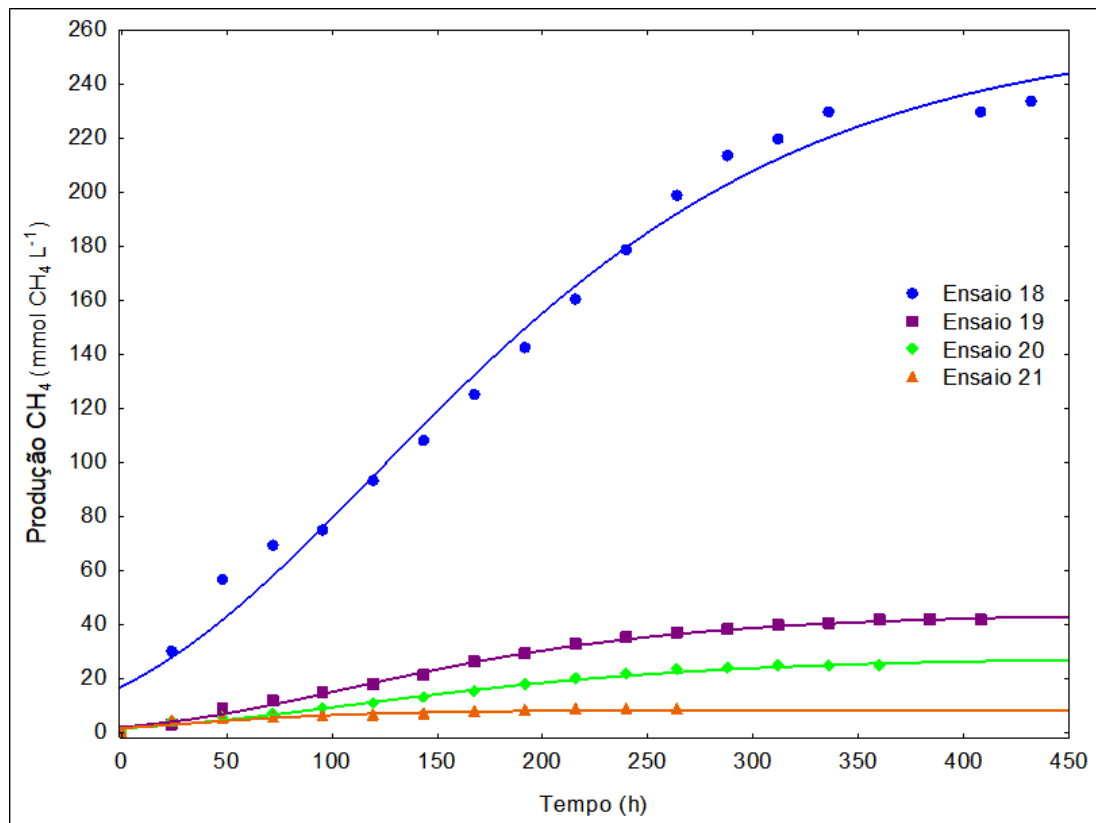
Inóculo	Glicerol inicial (gL ⁻¹)	Condições experimentais			Metabólitos gerados	Rendimento (mols H ₂ mol glicerol _{cons} ⁻¹)	Ref.
		Temp . (°C)	pH	Modo de Operação			
Cultura mista termofílica	6,27; 9,20; 11,95 e 15,11	55	5,5	Batelada	1,3-PD, etanol, butanol, propanol, ácido acético, ácido butírico	1,37; 1,58; 1,02; 1,10.	Este trabalho
Cultura mista termofílica	20,33	55	5,5	Batelada	1,3-PD, etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido butírico e ácido propiônico	1,37	SITTYUNDA e REUNGSANG (2012)
<i>Klebsiella</i> sp. TR17	11,14	40	5,5	Batelada	Etanol, 1,3-PD e 2,3-butanodiol	0,26	CHOOKAEW, O-THONG e PRASERTSAN (2014)
Cultura mista	20 g DQO L ⁻¹	37	5,5	Batelada	Etanol, ácido acético e ácido butírico	1,75	RODRIGUES <i>et al.</i> (2020a)
Cultura mista termofílica	TCOs de 37,5 e 75 g/Ld	55	5,5	UASB	Etanol, 1,3-PD	1,08 e 1,69	SITTYUNDA e REUNGSANG (2020)
Cultura mista enriquecida	Variações na DQO (g DQO L ⁻¹): 20; 40	37	5,5	Batelada (250 ml)	Acetona, ácido isobutírico, ácido butírico, propanol e 1,3-PD	3,01; 2,45	RODRIGUES <i>et al.</i> (2020b)
Lodo mesofílico de reator UASB	17,1	30	4,5	AFBR	Ácido propiônico e 1,3-PD	0,17	PARANHOS e SILVA (2020)

FONTE: Próprio Autor

5.7. Produção de metano

Com os efluentes dos ensaios 14 a 17, montou-se reatores para a produção de metano em condições termofílicas. Nesses reatores, adicionou-se somente o inóculo 5 (sem pré-tratamento) e o efluente dos reatores alimentados com glicerol bruto e esgot sanitario. O ensaio 18 (contendo o efluente do ensaio 14) foi o que mais gerou metano, com 233,51 mmols $\text{CH}_4 \text{ L}^{-1}$. À medida que as concentrações dos efluentes aumentavam, a produção de biogás diminuía. Os resultados para os ensaios 19, 20 e 21 foram, respectivamente (mmols $\text{CH}_4 \text{ L}^{-1}$): 41,59, 24,44 e 8,40 (Figura 29 e Tabela 17). Os valores que compuseram a Figura 29 estão no Anexo F.

Figura 29 - Produção acumulativa de metano nos ensaios 18 a 21



FONTE: Próprio autor

Tabela 17 - Principais resultados obtidos nos ensaios 18, 19, 20 e 21 realizados com efluentes dos ensaios 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

	Ensaio 18	Ensaio 19	Ensaio 20	Ensaio 21
pH final	8,1	7,6	7,4	7,4
Tempo de operação (h)	456	408	360	264
Consumos de DQO (%)	90	45,6	30,9	23,1
Consumos de Glicerol (%)	35,6	12,2	6,0	3,3
Produção máxima CH₄ (L)	2,83±0,004	0,50±0,003	0,29±0,009	0,10±0,00
Produção máxima CH₄ (mmol L⁻¹)	233,51±0,35	41,59±0,23	24,44±0,76	8,03±0,06
Tempo (h)	312	360	264	216
Rendimentos				
L CH₄ g⁻¹ DQO consumida	0,16	0,04	0,02	0,00
mmol CH₄ g⁻¹ DQO consumida	13,0	3,0	2,0	0,7
L CH₄ g⁻¹ Glicerol consumido	6,02	4,5	0,96	0,19
mmol CH₄ g⁻¹ Glicerol consumido	490,0	380,0	80,0	10,0
P (mmol L⁻¹)	260,13	44,0	27,81	8,27
Rm (mmol L⁻¹ h⁻¹)	0,79	0,17	0,10	0,05
λ (h)	0,68	12,99	6,91	26,03
R²	0,993	0,998	0,995	0,957

FONTE: Próprio autor

Uma carga orgânica elevada pode atuar como inibidor da produção de metano. Silva *et al.* (2018) estudaram a produção de hidrogênio e metano a partir da co-digestão de resíduos alimentares (RA), lodo de esgoto (LE) e glicerol bruto (GB) em um sistema anaeróbio de acidogênese-metanogênese de dois estágios sob condições mesófilas (35°C). O efeito da adição de glicerol (1 e 3% v/v) como co-substrato foi

avaliado em misturas ternárias (RA + LE + GB), com a concentração de todos os substratos mantida em 10 g SV L⁻¹. Apesar de obterem um maior rendimento de H₂ na mistura com 3% de glicerol, a maior produção de metano (342 ml CH₄ g⁻¹ SV) foi alcançado no teste suplementado com 1% de glicerol. Com 3% de glicerol, os autores observaram reduções abruptas no teor de CH₄ do biogás e nos valores de pH decorrentes da instabilidade no processo de metanogênese ao longo do experimento.

Concentrações superiores a 1% v/v de glicerol podem resultar no acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) nos reatores, o que pode dificultar a atividade metanogênica e potencialmente desestabilizar os experimentos de produção de metano (NGHIEM *et al.*, 2014). O efeito adverso do acúmulo de AGV também foi notado por Martín *et al.* (2013), que estudou a co-digestão anaeróbia de resíduos de casca de laranja com glicerol residual (proporção de 1: 1 com base na DQO) em condições mesofílicas e semicontínuas. Esses autores observaram que o processo permaneceu estável com cargas orgânicas (expressas em termos de sólidos voláteis) de até 2,1 g SV L⁻¹. Em matérias orgânicas mais elevadas, o acúmulo de AGV e a diminuição do pH desestabilizaram o processo.

Outra justificativa é a formação de ácido propiônico. Além disso, foi relatado que o uso de maiores concentrações de glicerol leva a produção de 1,3-PD (SILVA *et al.*, 2017). A degradação do glicerol em sistemas metanogênicos ocorre pela conversão de 1,3-propanodiol em ácido propiônico (WATANABE *et al.*, 2013). Portanto, é possível que a presença desse ácido tenha influenciado a produção de CH₄ e causado mudanças abruptas no pH do meio durante o experimento. O pH só foi medido no início e no fim do experimento. Além disso, não foi realizada a análise de ácidos e álcoois em ensaios de produção de metano.

5.7.1. Comparação da produção de metano com a literatura

São escassas as pesquisas avaliando a produção de metano em condições termofílicas, principalmente tendo o glicerol como substrato (Tabela 18). Yang, Tsukahara e Sawayama (2007) estudaram a biodegradação eficiente de resíduos sintéticos contendo glicerol usando biorreator de leito fixo embalado com poliuretano, em modo semicontínuo para remoção de glicerol em condições anaeróbias mesofílicas (35°C) e termofílicas (55°C). Os reatores foram montados contendo meio

sintético (252 ml) e glicerol (4,03 g L⁻¹), além de lodo metanogênico mesofílico e termofílico derivado de sistema de tratamento de águas residuárias. O melhor desempenho foi obtido no reator sob condições termofílicas (55°C), além de apresentarem concentrações de metano relativamente mais elevadas na composição do biogás. A eficiência de remoção de DQO foi mais estável e superior em condições termofílicas do que em condições mesofílicas, com remoção média de carbono orgânico dissolvido de 86,7% a uma taxa de carregamento orgânico de 1,00 g L⁻¹d⁻¹. Além disso, o reator termofílico apresentou o maior rendimento de metano com cerca de 0,45 L CH₄ g⁻¹ DQO_{adicionado} a uma TCO de 0,70 g/L dia. Os resultados indicaram que a produção de metano a partir de resíduos sintéticos contendo glicerol em condições termofílicas proporciona melhor desempenho de digestão do que em condições mesofílicas. No presente estudo, o maior rendimento obtido foi de 0,12 L CH₄ g⁻¹ DQO_{adicionado}, relativamente menor que o obtido pelos autores. Porém, a concentração de glicerol adicionada foi bem inferior coloque o valor aqui, visto que este ensaio foi conduzido com o resíduo da produção de hidrogênio

López *et al.* (2009) estudaram a digestão anaeróbia de três variações de glicerol usando lodo granular e não granular, em condições mesofílicas e reatores em batelada, mantidos a 25°C e alimentados com meio de cultivo sintético. Os rendimentos (ml CH₄ g DQO_{removido}⁻¹) foram de: 292 ml CH₄ g DQO_{removido}⁻¹ (glicerol acidificado + lodo granular); 288 ml CH₄ g DQO_{removido}⁻¹ (glicerol acidificado + lodo não granular) e 356 ml CH₄ g DQO_{removido}⁻¹ (glicerol destilado + lodo granular). A eficiência do processo em cada caso foi: 76% (glicerol acidificado + lodo granular); 75% (glicerol acidificado + lodo não granular) e; 93% (glicerol destilado + lodo granular). Tais resultados foram superiores ao presente estudo (160 ml CH₄ g DQO_{removido}⁻¹); entretanto, foram usados efluentes da produção de H₂, sem a adição de outros nutrientes, glicerol bruto contendo contaminantes e sem pré-tratamentos que oneram a aplicação em larga escala.

Astals, Nolla-Ardèvol e Mata-Alvarez (2013) estudaram o uso do glicerol bruto como co-substrato para esterco suíno, em reatores de tanque agitado de 5,5 L, a 60 rpm, semi-contínuos, com volume de trabalho de 4 L, a 55°C, e TRH de 15 dias. Os resultados mostraram que a co-digestão anaeróbia termofílica de esterco suíno suplementado com 3% de glicerol, em peso, foi satisfatória. A produção específica de biogás do digestor foi 180% superior à obtida pelo digestor controle, que foi alimentado

apenas com esterco suíno. Foi gerado um total de 233,12 L de biogás, com TCO de $2,6 \pm 0,1$ g SV $L_R^{-1} d^{-1}$, com remoção de 57,7% da DQO. Os autores atribuíram a melhora nos resultados obtidos devido ao dobro da taxa de carregamento orgânico aplicada, à alta biodegradabilidade do glicerol bruto, à ligeira redução da concentração de amônia livre e à otimização da relação carbono-nitrogênio. No presente estudo, o maior volume de CH_4 obtido foi 2,83 L, com remoção de 90% da DQO. Uma provável causa dessa diferença foi a presença de outra fonte de carbono (esterco suíno) misturada ao glicerol e mais rica em outras fontes de nutrientes e carbono do que o esgoto sanitário. Além disso, os autores não especificaram se o biogás era constituído somente de metano ou se a fermentação estava envolvida no processo.

Castrillón *et al.* (2013) estudaram a melhoria na produção de biogás a partir de esterco bovino (EB), ao adicionar resíduos alimentares (RA) e glicerol bruto (GB) como co-substratos. Para tanto, diferentes quantidades de RA e GB foram adicionadas ao EB e co-digeridos em um reator de leite induzido (IBR) a 55°C. O pré-tratamento de sonicação foi implementado na mistura EB+GB, aplicando 550 KJ kg^{-1} ST para aumentar a biodegradabilidade desses co-substratos. Os melhores resultados foram obtidos com misturas de 87/10/3 (EB/RA/GB) (m/m) operando a uma taxa de carregamento orgânico de 7 g DQO $L^{-1} d^{-1}$, TRH de 20 dias, obtendo 92% de remoção de DQO e uma taxa de produção de metano de 2,6 L $CH_4 L^{-1} d^{-1}$. No presente estudo, foram produzidos 0,59 L $CH_4 L^{-1} d^{-1}$, com 90% da remoção de DQO. O tempo de trabalho dos reatores foram diferentes, sendo 19 dias para este trabalho e 40 dias para o ensaio dos autores. Outro fator é a presença de açúcares e outras fontes de carbono encontradas no esterco bovino e nos resíduos alimentares, os quais impulsionaram a produção de biogás. Além disso, a glicose pode impulsionar a produção de metano na co-fermentação 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 Metano (SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019).

Tabela 18 – Comparação da produção de metano a partir de efluentes fermentativos com a literatura

Substrato	Glicerol inicial	Condições experimentais			Rendimento/taxa de produção	Ref.
		Temp. (°C)	pH	Modo de Operação		
Efluente de reatores fermentativos	1,31 g L ⁻¹	55	7,0	Batelada	120 ml CH ₄ g ⁻¹ DQO _{adicionado} ou 160 ml CH ₄ g DQO _{removido} ⁻¹	Presente estudo
Resíduo sintético e glicerol bruto	4,03 g L ⁻¹	55	-	Reator de leito fixo embalado com poliuretano	450 ml CH ₄ g ⁻¹ DQO _{adicionado}	YANG, TSUKAHARA e SAWAYAMA (2007)
<ul style="list-style-type: none"> • Glicerol purificado + lodo granular • Glicerol purificado + lodo não granular • Glicerol destilado + lodo granular 	1 g DQO L ⁻¹	25	-	Batelada	292 ml CH ₄ g DQO _{removido} ⁻¹ ; 288 ml CH ₄ g DQO _{removido} ⁻¹ 356 ml CH ₄ g DQO _{removido} ⁻¹	LÓPEZ <i>et al.</i> (2009)
Esterco suíno e glicerol bruto	3% (m/m)	55	7,7	Tanque agitado semicontínuo	233,12 L de biogás	ASTALS, NOLLA-ARDEVOL E MATA-ALVAREZ (2013)
Esterco bovino, resíduos alimentares e glicerol bruto	87/10/3 (m/m)	55	-	IBR	2,6 L CH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹	CASTRILLÓN <i>et al.</i> (2013)

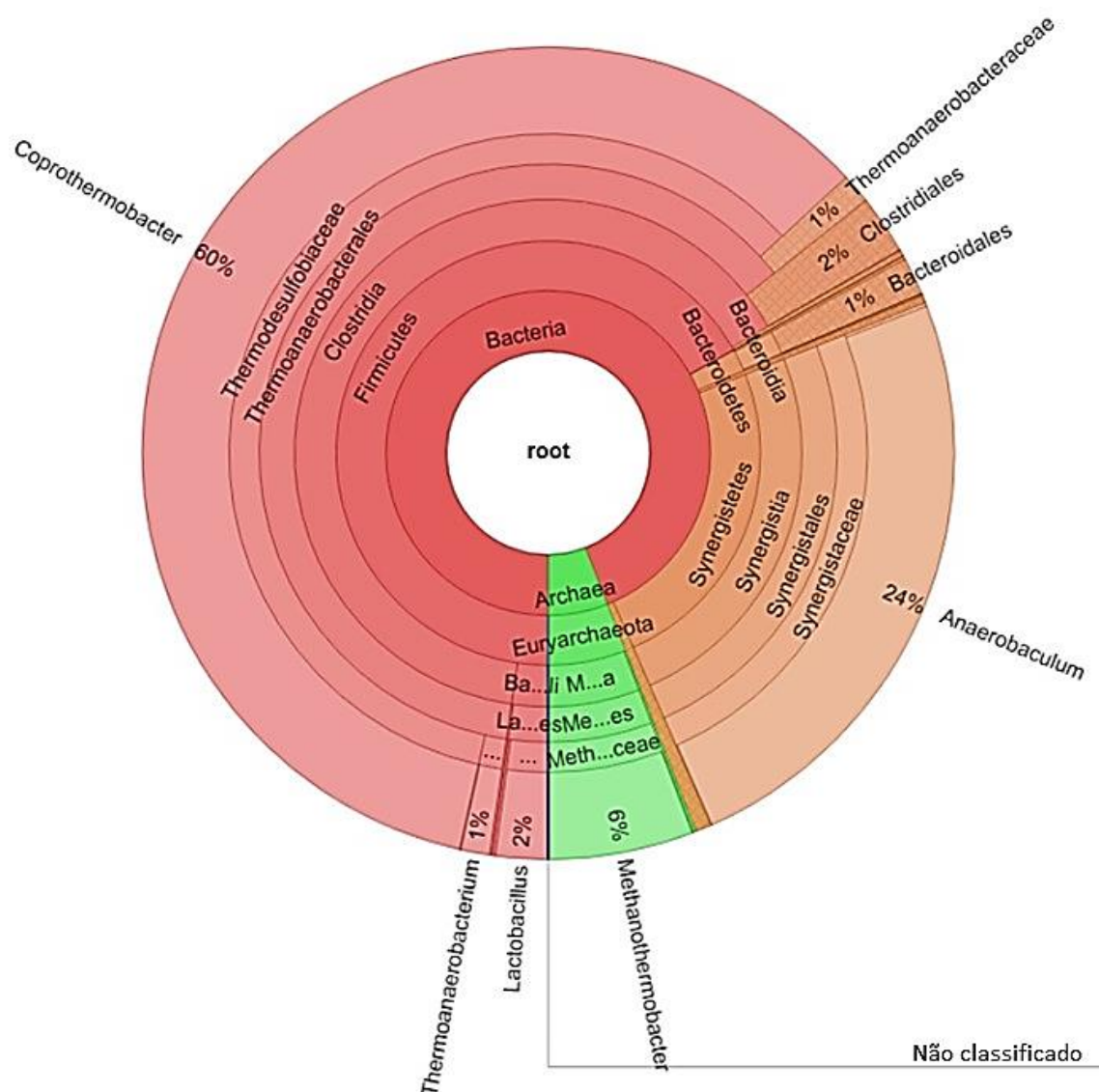
FONTE: Próprio autor

5.8. Caracterização dos inóculos

5.8.1. Inóculo 1

Foi realizada análise de Biologia Molecular do inóculo 1 (termofílico) submetido ao tratamento ácido e utilizado ao longo dos testes preliminares. A abundância relativa foi de microrganismos pertencentes ao Domínio Bacteria (94%) em sua maioria, além do domínio Archaea (6%). Por essa análise, foi confirmado que, mesmo com o pré-tratamento ácido aplicado, ainda existiam arqueias metanogênicas que resistiram; as quais, provavelmente, produziram metano durante os testes realizados, conforme verificado e descrito anteriormente. Em relação ao gênero predominante (Figura 30), 60% da abundância relativa era de *Coprothermobacter*, 24% de *Acetomicrobium* e 2% de *Lactobacillus*.

Figura 30 - Distribuição da abundância relativa dos gêneros no inóculo 1



Fonte: Próprio Autor

Coprothermobacter proteolyticus é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa, não motora e não formadora de endósporos. Foi inicialmente considerada um membro do gênero *Thermobacteroides* e posteriormente reclassificada (ALEXIEV *et al.*, 2014).

O gênero *Thermoanaerobacterium* é o mais presente em trabalhos envolvendo a produção termofílica de H₂, a partir de diversos substratos, como resíduos alimentares (SHIN *et al.* 2003), vinhaça de cana (SANTOS *et al.* 2014; FERRAZ

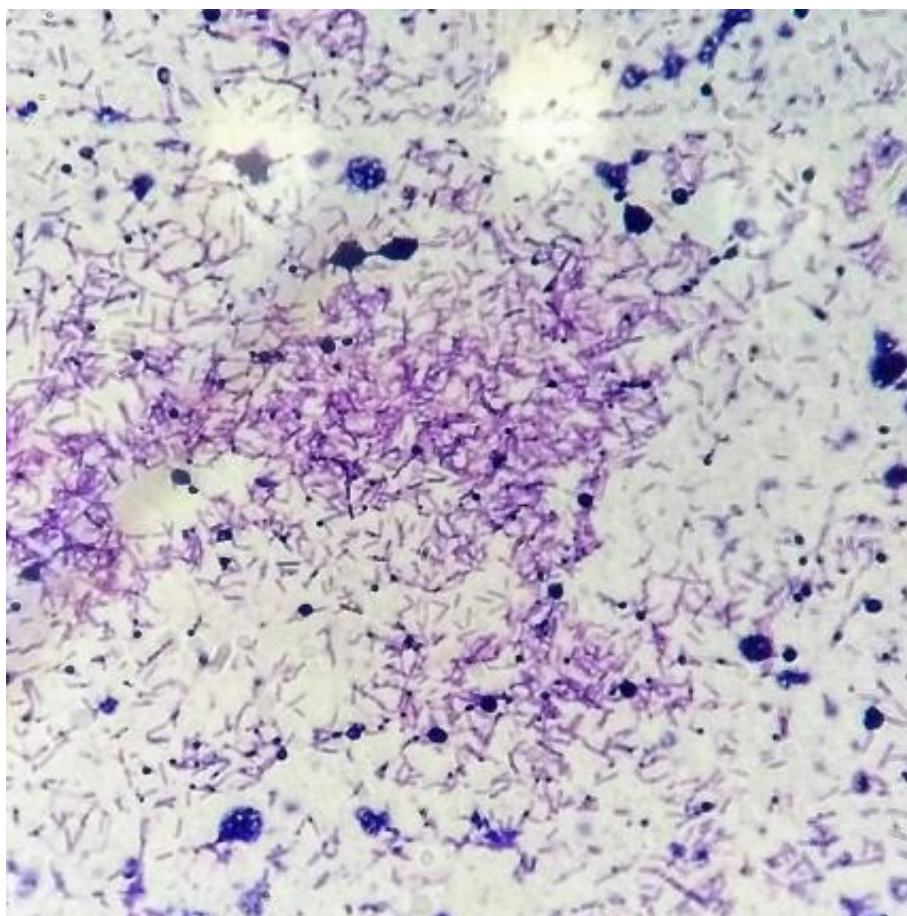
JUNIOR *et al.* 2015) e soro de queijo (OTTAVIANO *et al.* 2017). Entretanto, no presente estudo, esse gênero foi verificado em 1% no inoculo 1.

O gênero *Coprothermobacter* geralmente está associado à população microbiana de digestores devido às suas propriedades proteolíticas. O crescimento de *Coprothermobacter* spp. em substratos contendo proteína também está intimamente associado à produção de hidrogênio. Além disso, o hidrogênio deve ser um dos transportadores mais importantes na transferência de elétrons interespecies entre *Coprothermobacter* sp e arqueias metanogênicas. Portanto, *Coprothermobacter* spp. pode estar envolvida em processos biológicos de degradação de substratos orgânicos como o glicerol bruto a ácidos graxos voláteis e álcoois, além da metanogênese hidrogenotrófica, em digestores anaeróbios (TANDISHABO *et al.*, 2012), conforme verificado no presente estudo.

5.8.2. Inóculo 3

Foi verificado predomínio de bacilos Gram+ (Figura 31), morfologia característica de bactérias fermentativas, como *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium*, com potencial de produção de H₂ (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019).

Figura 31 - Microscopia do inóculo 3 com predomínio de bacilos gram+

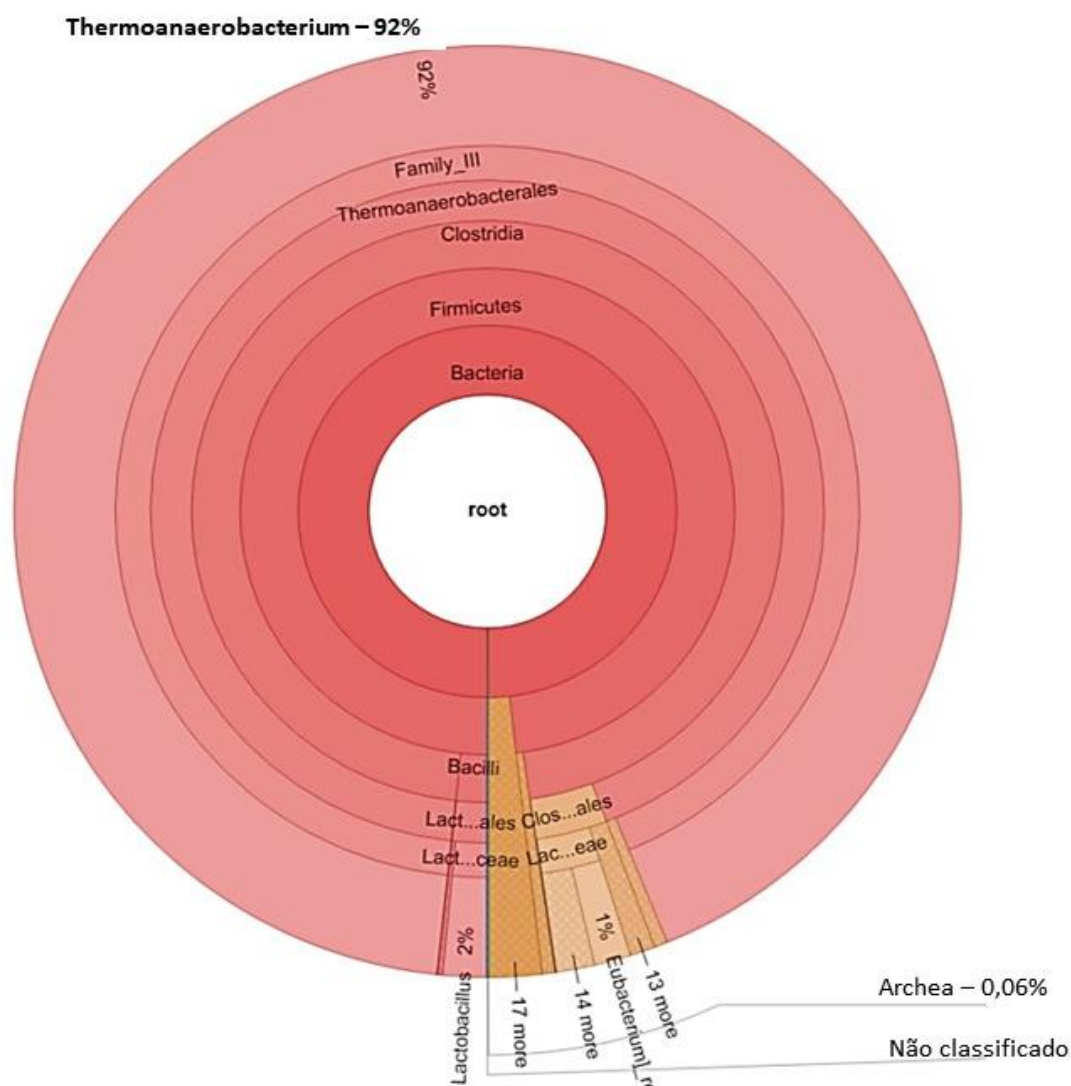


Ampliação 1000x

Fonte: Próprio Autor

Nas análises de biologia molecular (Figura 32) foi verificada abundância relativa de 100% dos microrganismos pertencem ao domínio Bacteria, dos quais 91% das bactérias provenientes do consórcio pertenciam à espécie *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*; espécie comumente encontrada em reatores termofílicos operados à 55°C (OTTAVIANO, 2017). Não foi verificada presença de arqueias, comprovando a eficiência do pré-tratamento aplicado.

Figura 32 - Distribuição da abundância relativa dos gêneros no inóculo 3



Fonte: Próprio Autor

O gênero *Thermoanaerobacterium* é comumente encontrado em reatores fermentativos na biodigestão de diversos resíduos orgânicos para a produção de H₂ em condições termofílicas. *Thermoanaerobacterium*, *Thermohydrogenium kirishiense*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e *T. kirishiense* foram identificados por OTTAVIANO (2017) em reatores anaeróbios de leite fluidizado alimentados com solução de soro de queijo em pó; o mesmo gênero foi encontrado por SHIN (2003) em reatores alimentados com resíduos alimentares, entre outros. A análise de Biologia

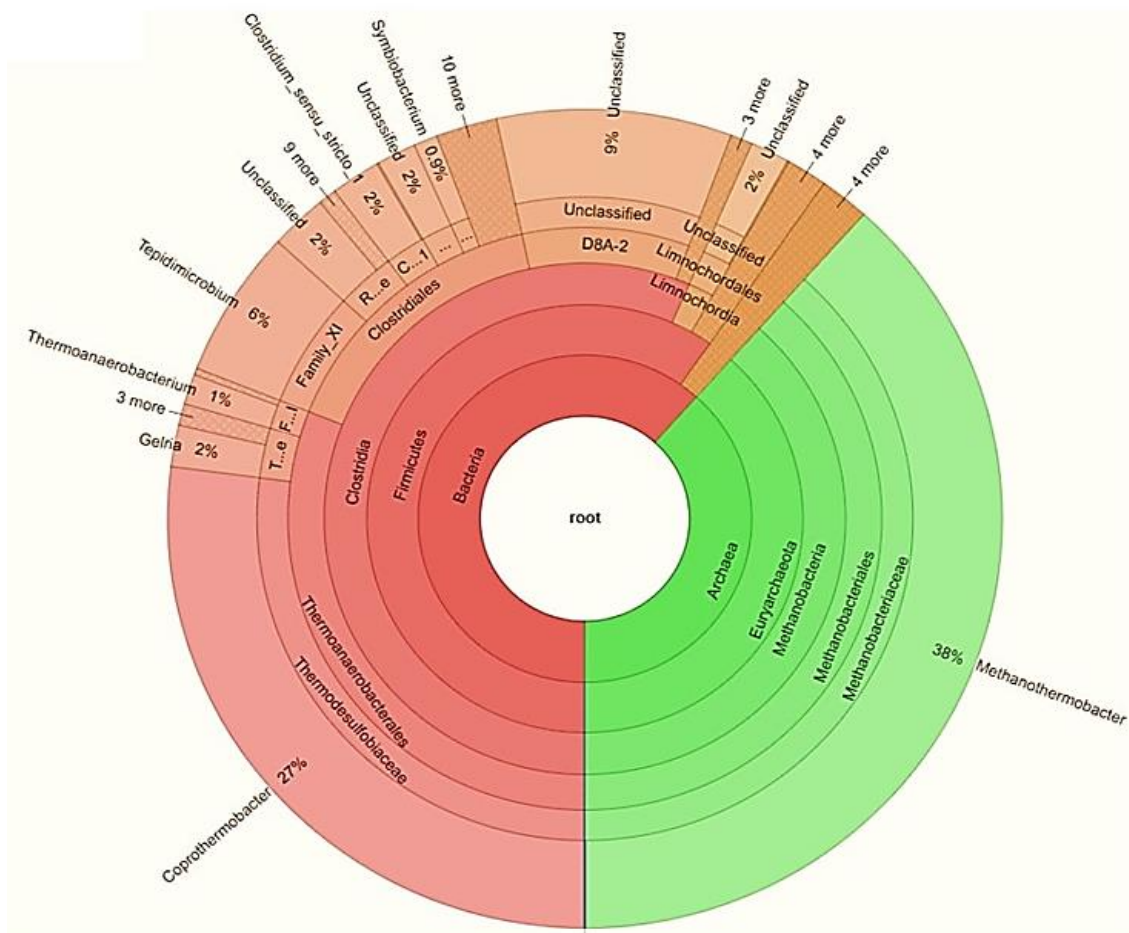
Molecular comprovou que o consórcio termofílico era formado, predominantemente por *T. thermosaccharolyticum* (91%).

A maioria das bactérias identificadas em digestores anaeróbios geradores de H₂ é pertencente aos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria* (ARIESYADY et al., 2007 Maintinguer et al, 2008, Maintinguer et al, 2011). Ambos os inóculos possuíam abundância relativa de *Firmicutes*, principalmente da classe *Clostridia*, representando 64% dos microrganismos do inóculo 1 e 97% no inóculo 3.

5.8.3. Inóculo 5

O inóculo 5 era metanogênico, não sendo realizado pré-tratamento. Comparando o inoculo 5 com o inóculo 1, o qual proveio do mesmo reator, mas sofreu pré-tratamento ácido, observou-se que ocorreu um aumento na abundância relativa de archaeas, constituída somente do gênero *Methanothermobacter* (Figura 33), a qual também estava presente no inóculo pré-tratado. Esse gênero pode utilizar CO₂ e H₂ para produzir CH₄. Para o domínio Bacteria foi verificada abundancia relativa do gênero *Coprothermobacter*.

Figura 33- Distribuição da abundância relativa dos gêneros no inóculo 5



Fonte: Próprio Autor

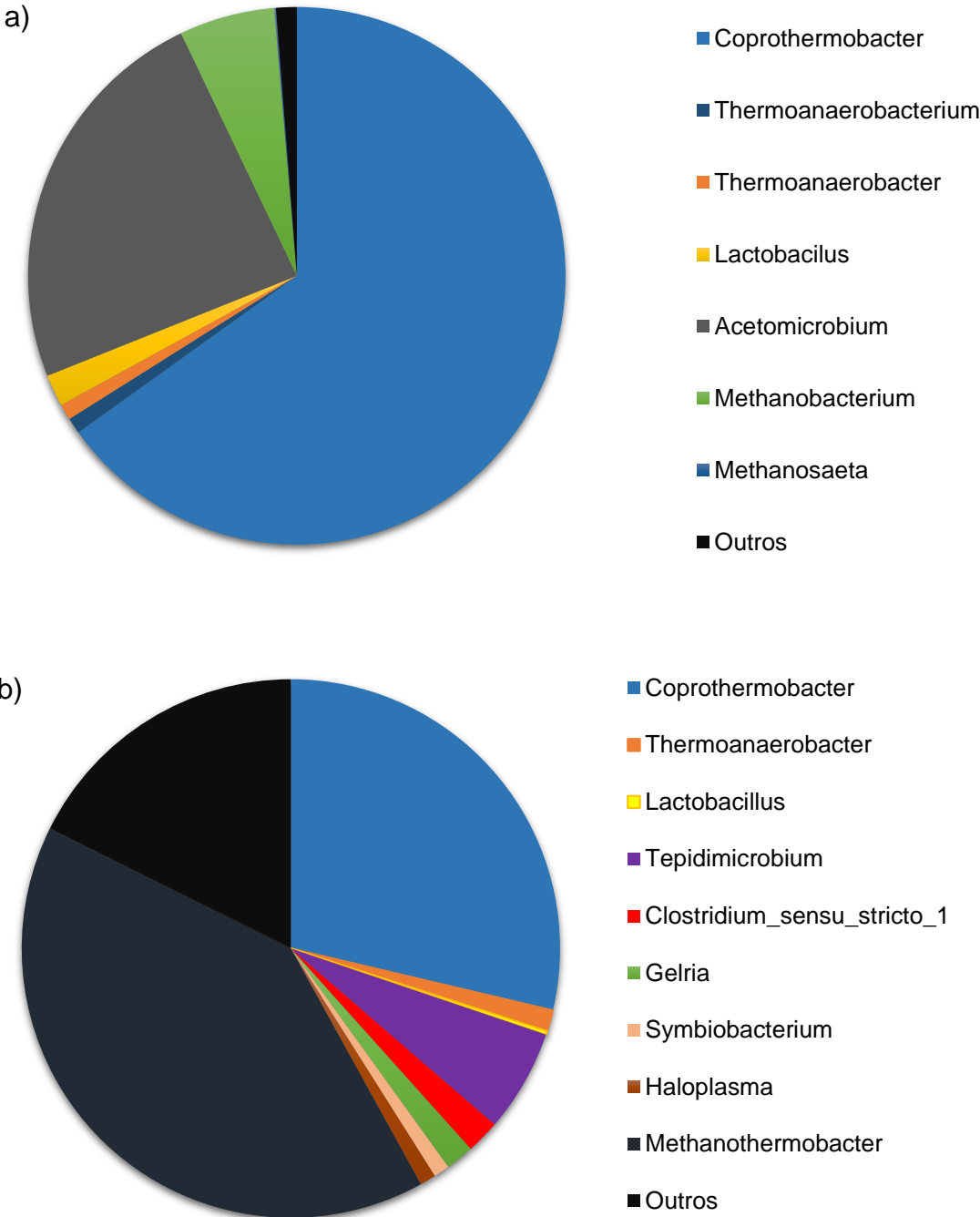
Sasaki *et al.* (2011) estudou a degradação sintrófica de materiais proteicos pelas cepas termofílicas *Coprothermobacter proteolyticus* e *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Os efeitos das metanogênicas hidrogenotróficas na degradação de proteínas foram investigados usando a cepa bacteriana proteolítica CT-1 que foi isolada de um reator de leito fixo metanogênico termofílico (55°C) degradando lixo. A cepa CT-1 foi intimamente relacionada ao *Coprothermobacter proteolyticus*, que é frequentemente encontrada em reatores metanogênicos que degradam resíduos sólidos orgânicos. A cepa CT-1 foi cultivada na ausência e na presença de *Methanothermobacter thermautotrophicus* usando três substratos proteicos. O hidrogênio produzido nas monoculturas foi convertido em metano nas co-culturas. Esses resultados sugeriram que as bactérias proteolíticas termofílicas têm função

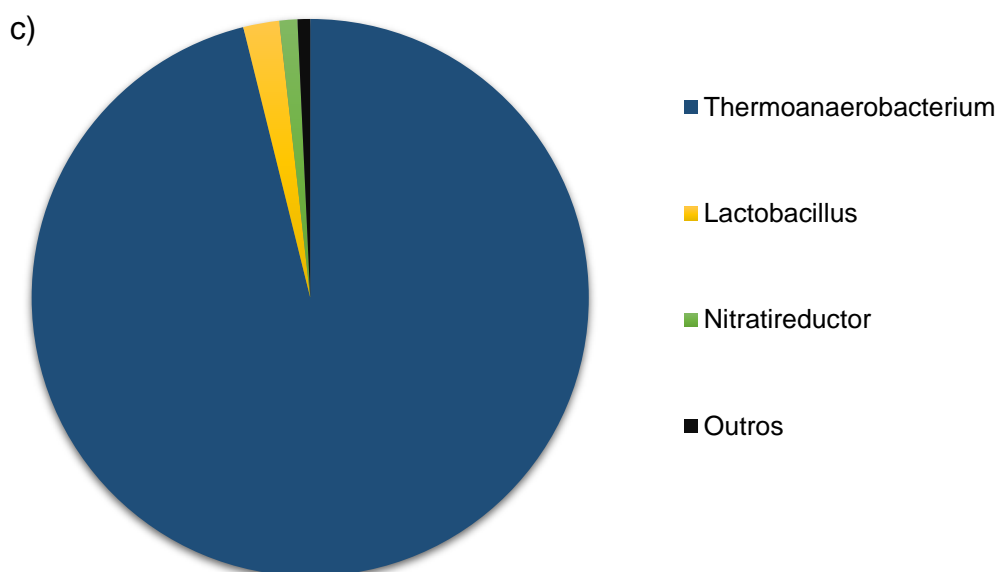
importante como consumidoras de hidrogênio em biorreatores e degradam sintroficamente proteína em ambiente metanogênico. Nesse estudo, o inóculo 5 possuía grande abundância de dos gêneros *Coprothermobacter* e *Methanothermobacter*, o que pode ter contribuído para a geração de metano a partir dos metabólitos resultantes da geração de hidrogênio.

Comparando as abundâncias relativas das ordens dos três inóculos analisados (Figura 34), observou-se que, após o tratamento ácido no lodo termofílico, ocorreu uma seleção no inóculo 1 (Figura 31a), favorecendo os gêneros *Coprothermobacter* (67,9%) e *Acetomicrobium* (25%), quando comparado com o inóculo 5, *in natura*. Este inóculo possuía abundância relativa mais elevada de arqueias, com predominância de Methanobacteriales (38,3%) (Figura 34b), o que condiz com os resultados na geração de metano nos ensaios 18, 19, 20 e 21, nos reatores alimentados com efluentes dos ensaios 14, 15, 16 e 17, respectivamente, e inóculo *in natura*.

O inóculo 3 foi extremamente selecionado após as diluições seriadas, a qual resultou em uma abundância relativa de 92% de Thermoanaerobacterales (Figura 34c), contendo uma variedade microbiológica bem reduzida, a qual gerou hidrogênio, etanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico e ácido butírico. O gênero *Thermoanaerobacterium* foi relacionado com a produção de H₂, conforme descrito anteriormente. Vale ressaltar que as diluições seriadas e o crescimento do inóculo foram realizadas contendo glicerina PA como fonte de carbono e tal fato deve ter influenciado na seleção dos gêneros, podendo ter prejudicado a produção de H₂ na presença de glicerol bruto, devido, principalmente a presença de contaminantes e a falta dos demais componentes do meio de cultivo RCM, como foi observado quando se compara os ensaios 7 (meio de cultivo modificado com glicerina PA), ensaio 10 (meio de cultivo modificado com glicerol bruto) e o ensaio 11 (glicerol bruto com esgoto sanitário), os quais geraram, respectivamente (mmol H₂ L⁻¹): 50,03; 43,51 e 28,94.

Figura 34 - Distribuição dos gêneros dos inóculos 1 (a), 5 (b) e 3 (c)





FONTE: Próprio autor

6. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares mostraram que maiores produções de hidrogênio foram obtidas com inóculo termofílico, a 55°C, mantidos sob modo estático. Em todos os ensaios de fermentação, houve elevado remoção de glicerol, com pequenas variações de DQO, devido a formação de ácidos e álcoois.

Os contaminantes contidos no glicerol bruto interferiram na atividade dos microrganismos com conseqüente diminuição na produção de H₂, mesmo com adições de nutrientes ao meio de cultivo.

Na co-digestão de glicerol bruto com esgoto sanitário foram obtidas produções mais elevadas de H₂ para a condição com peptona+extrato de levedura, que demonstrou a dependência dos microrganismos a outras fontes nutricionais.

O pré-tratamento térmico no inóculo selecionou consórcios de bactérias anaeróbias capazes de gerar H₂, mais tolerantes a concentrações mais elevadas de glicerol bruto e, conseqüentemente, de inibidores como metanol e sabões a partir de glicerol bruto em concentrações de 20, 30, 40 e 50 g DQO L⁻¹, esgoto sanitário e extrato de levedura.

Gerações de etanol foram verificadas em todos os ensaios, principalmente nos reatores operados com 40 g DQO L⁻¹. Ou seja, a rota metabólica etanólica foi favorecida, além das produções de ácido acético, ácido butírico, propanol, butanol. Nos ensaios 40 e 50 g DQO L⁻¹ obteve-se 1,3-propanodiol, comumente obtido em maiores concentrações de glicerol bruto, comprovando o favorecimento da rota redutiva.

Somente o ensaio metanogênico operado com efluente fermentativo que continha 20 g DQO L⁻¹ produziu um maior volume de biogás, com remoção elevada de DQO. Ou seja, para os demais ensaios em concentrações mais elevadas DQO ocorreu inibição no processo de biodigestão anaeróbia com gerações reduzidas de metano.

Identificação biomolecular no inóculo 1, com pré-tratamento ácido, revelou abundância relativa majoritária por bactérias termofílicas do gênero *Coprothermobacter* (64%) e *Acetomicrobium* (25%). O inóculo 3 continha predomínio de bactérias do gênero *Thermoanaerobacterium* (92%), resultado da seleção ocorrida durante a diluição seriada. O inóculo 5, metanogênico, possuía predomínio dos gêneros *Coprothermobacter* (27%) e *Methanothermobacter* (38%), favorecidos pela presença de metabólitos secundários (ácidos e álcoois) da fermentação.

O glicerol bruto pode ser aplicado em reatores anaeróbios sob condição termofílica e gerar biocombustíveis tais como Hidrogênio, Metano, além de demais produtos de valor agregado como etanol, butanol e 1,3 propanodiol, não dependendo, necessariamente, de processos onerosos de purificação ou de preço de mercado para a sua exportação.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar o desempenho da fermentação termofílica em gliceróis brutos que possuam uma maior concentração de contaminantes, preferencialmente metanol e sabões, contribuindo para maior abrangência desse método de tratamento de resíduos.

Testar diluições dos efluentes fermentativos em esgoto sanitário para sua aplicação em maiores consumos de DQO e gerações de Metano.

Mais estudos devem ser realizados na digestão anaeróbia do glicerol bruto a fim de compreender a função de cada microrganismo nas rotas bioquímicas e nos metabólitos gerados, sob condições termofílicas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTALS, S.; NOLLA-ARDÉVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J.. Thermophilic co-digestion of pig manure and crude glycerol: process performance and digestate stability. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 166, n. 3, p. 97-104, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.004>.
- AKUTSU, Yohei et al. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.2558-2566, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.048>.
- APHA, AWWA and WEF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition, **American Public Health Associating**, Washington, D.C.
- ALEXIEV *et al.* Complete genome sequence of *Coprothermobacter proteolyticus* DSM 5265. **Genome Announc.** 2(3):e00470-14. 2014. doi:10.1128/genomeA.00470-14.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official method Cc 17-95. section C: moisture and volatile matter, air oven method.** In:_____. (Ed.). Official methods and recommended practices of AOCS. 6th ed. Urbana, 2009a.
- ANP.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 19 de novembro 2019.
- AQUINO, S. F. et al. **Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios.** Engenharia Sanitária Ambiental, v. 12, n. 2, p. 192-201, abr./jun. 2007
- ARDI, M.s.; AROUA, M.K.; HASHIM, N. Awanis. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 42, p. 1164-1173, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.091>.
- ARIESYADY, H. D.; ITO, T.; OKABE, S. Functional bacterial and archeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1554-1568, Apr. 2007.
- AZBAR, Nuri et al. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 34, n. 17, p.7441-7447, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.032>.
- BABA, Yasunori 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**, [s.l.], v. 140, p.342-348, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.020>.
- BIODIESELBR. Preços da glicerina atingem seu menor patamar em mais de dois anos.** 2019. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/glicerina/precos-da-glicerina-atingem-seu-menor-patamar-em-mais-de-dois-anos-080319>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

- BEGUM, Sameena; JUNTUPALLY, Sudharshan; ANUPOJU, Gangagni Rao; ESHTIAGHI, Nicky. Comparison of mesophilic and thermophilic methane production potential of acids rich and high-strength landfill leachate at different initial organic loadings and food to inoculum ratios. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 715, p. 136658-136641, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136658>
- BIEBL, H., MENZEL, K., ZENG, A. P., DECKWER, W. D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbial Biotechnology**, 52(3): 289-297, 1999.
- BOHON, M. D. et al. Glycerol combustion and emissions. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 33, n. 2, p. 2717-2724, 2011.
- BONDIOLI, P.; BELLA, D. L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol biodiesel. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol**, v.107, n.3, p.153- 157, 2005.
- BRITO, P.; **Apontamentos da unidade curricular Sistemas de Biomassa**, Instituto Politécnico de Bragança, 2013
- BUNDHOO, M.A. Zumar; MOHEE, Romeela. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 41, n. 16, p. 6713-6733, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>.
- CARDOSO, A. L.; NEVES, S. C. G.; SILVA, M. J. Esterification of oleic acid for biodiesel production catalyzed by SnCl₂: a kinetic investigation. **Energies**, Paris, v. 1, n. 2, p. 79-92, Sept. 2008.
- CASTRILLÓN, L.; MARAÑÓN, E.; FERNÁNDEZ-NAVA, Y.; ORMAECHEA, P.; QUIROGA, G.. Thermophilic co-digestion of cattle manure and food waste supplemented with crude glycerin in induced bed reactor (IBR). **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 136, p. 73-77, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.076>
- CÉSAR, A. DA S. et al. Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil. **Renewable Energy**, v. 133, p. 1147–1157, 2019.
- CHOOKAEW, Teera; O-THONG, Sompong; PRASERTSAN, Poonsuk. Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by thermotolerant *Klebsiella* sp. TR17. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.751-760, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.10.141>.
- COSTA, Talles Barcelos da. **PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO E CULTURA MISTA EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO TERMOFÍLICOS**. 2017. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.
- DINH, N. T.; HATTA, K.; KWON, S.; ROLLON, A.; NAKASAKI, K. Changes in the microbial community during the acclimation stages of the methane fermentation for the treatment of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 240 – 249, 2014.

DROŹDŹYŃSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. **Journal of Biotechnological, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 1, p. 92-100, 2011.

ETCHEBEHERE, C. et al. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3371–3384, 2016

EPE, 2020. Análise de conjunto dos biocombustíveis, ano 2019. Ministério de Minas e Energia. Rio de Janeiro. Acesso em 13 de agosto de 2020. Disponível em <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos>

FERRAZ JÚNIOR, D.A.N., ETCHEBEHERE, C., ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packedbed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology** 186, 81–88, 2015. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.035

FERRAZ JÚNIOR, D.A.N., ETCHEBEHERE, C., ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packedbed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 186, p, 81–88, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.035

FERNÁNDEZ, C. et al. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 81, p.55-62, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.05.024>

FERREIRA, Tiago Borges et al. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 43, n. 41, p.18908-18917, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.08.177>.

FERREIRA, Tiago Borges; REGO, Gabriel Catucci; RAMOS, Lucas Rodrigues; MENEZES, Camila Aparecida de; SOARES, Laís Américo; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; VARESCHE, Maria Bernadete Amâncio; SILVA, Edson Luiz. HRT control as a strategy to enhance continuous hydrogen production from sugarcane juice under mesophilic and thermophilic conditions in AFBRs. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 44, n. 36, p. 19719-19729, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.050>.

GARLAPATI, V. K., SHANKAR, U., BUDHIRAJA, A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnology Reports**, 9: 9-14, 2016.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 391-396, 2005

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.

GUWY, A.J.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; ROZZI, A.G. Hydrogen production in a high rate fluidized bed anaerobic digester. **Water Research**, v. 31, p. 1291 – 1298, 1997.

HE, Q. S., MCNUTT, J., YANG, J.; Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 71: 63–76. 2017

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgoto doméstico**. 3. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995. 932 p.

JUAN, J. C.; ZHANG, J. Z.; YARMO, M. A. 12-Tungstophosphoric acid supported on MCM-41 for esterification of fatty acid under solvent-free condition. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 267, n. 4, p. 265-271, Apr. 2007.

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.

KHAMAISEH, E. I.; KALIL, M. S.; DADA, O.; YUSOFF, W. M. W. Date Fruit as Carbon Source in RCM-Modified Medium to Produce Biobutanol by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 11, p. 1160-1165, 2012.

KIM, M.; LEE, D.; KIM, D. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8712 – 8718, 2011.

KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 27, p. 11749-11755, 2013.

KONGJAN, Prawit; O-THONG, Sompong; ANGELIDAKI, Irini. Performance and microbial community analysis of two-stage process with extreme thermophilic hydrogen and thermophilic methane production from hydrolysate in UASB reactors. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 102, n. 5, p. 4028-4035, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.009>.

Krasňan, V., PIŽ, M., Marr, A. C., Markošová, K., Rosenberg, M., Rebroš, M. Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. **Biochemical Engineering Journal**, 134: 114-119, 2018.

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.

LEE, Dong-yeol et al. Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester

sludge. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p.42-47, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.037>.

LEVIN, B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173 – 185, 2004

LIU, Bingchuan et al. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 38, n. 8, p.3196-3205, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.135>.

LÓPEZ, J. A. S.; SANTOS, M. A. M.; PÉREZ, A. F. C.; MARTÍN, A. M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5609-5615, dez. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.017>

LOVATO, G.; BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Effect of feed strategy on methane production and performance of an AnSBBR treating effluent from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 2007 – 2029, 2012.

LUO, Gang et al. Exploring optimal conditions for thermophilic fermentative hydrogen production from cassava stillage. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 35, n. 12, p.6161-6169, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.126>.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n. 10, p. 1-15, Oct. 1999.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, Aug. 2008a.

MAINTINGUER, S. I. et al. Degradação anaeróbia de fenol em reatores em batelada sob condições fermentativas. **Tecnológica**, v. 12 n. 2, p. 47-55, 2008b.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12198-12204, 2012

MARTÍN; FERNÁNDEZ; SERRANO; SILES. Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Waste Manage**, v. 33, n. 33, p. 1633-1639, jul 2013. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.027>

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7404-7416, Sep,2009.

MARU, B. T. et al. Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp. **Fuel**, v. 186, p. 375-384, 2016

ME, 2020. **Estatísticas de Comércio Exterior**. Ministério da Economia, Secretaria Especial de Comércio Exterior e Assuntos Internacionais, Brasília. Acesso em 16 de Março de 2020, disponível em <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>

MOLINO, A. et al. Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. **Fuel**, [s.l.], v. 103, p.1003-1009, jan. 2013. Elsevier BV.

MU, Y. et al. Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumonia* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1755-1759, 2006.

NGHIEM et al. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v. 95, p. 160-166, nov 2014.

NIU, Qigui; HOJO, Toshimasa; QIAO, Wei; QIANG, Hong; LI, Yu-You. Characterization of methanogenesis, acidogenesis and hydrolysis in thermophilic methane fermentation of chicken manure. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 244, p. 587-596, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.074>.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: a review. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 21-39. 4 fev. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; INTRASUNGKHA, N.; DHAMWICHUKORN, S.; BIRKELAND, N.K. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium-rich* sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1221 – 1231, 2008.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELAND, N. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 909 – 918, 2009.

O-THONG, Sompong; MAMIMIN, Chonticha; KONGJAN, Prawit; REUNGSANG, Alissara. Thermophilic Fermentation for Enhanced Biohydrogen Production. In: ASHOK PANDEY (ed.). **Biohydrogen**. 2. ed. [S. L.]: Elsevier. Cap. 5. p. 123-139. 2019.

OTTAVIANO, Livia Maria et al. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.4848-4860, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.168>.

PARANHOS, Aline Gomes de Oliveira; SILVA, Edson Luiz. 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**, [S.L.], v. 138, p. 1-10, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105575>.

PHUKINGNGAM, D.; CHAVALPARIT, O.; SOMCHAI, D.; ONGWANDEE, M. Anaerobic baffled reactor treatment of biodiesel-processing wastewater with high strength of metanol and glycerol: reactor performance and biogas production. **Chemical Papers**, v. 65, p. 644 – 651, 2011.

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.

PERRY, R.H.; GREEN, D.W.; MALONEY, J.O.H.; Perry's chemical engineers' handbook. 7th ed. USA: McGraw-Hill; 1997. PRISCILLA, A.S.; JOE, M.P.; WALLIS, A.L.; BRUCE EL. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnol Bioeng**. 2009; 104:1098e106

QUISPE, César A.g.; CORONADO, Christian J.r.; CARVALHO JUNIOR, João A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 27, p.475-493, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.017>.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 5, p.385-405, 22 out. 2011.

RODRIGUES, Caroline Varella *et al.* APPLICATIONS OF BIODIESEL AND CRUDE GLYCEROL: THE PRODUCTS GENERATED BY TRANSESTERIFICATION PROCESS. In: ANITA BECKER (ed.). **Transesterification: process, mechanism and applications**. [Si]: Nova Science Pub Inc, 2018. Cap. 3. p. 83-122.

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, Caroline Varella et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.144-154, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.174>

RODRIGUES, Caroline Varella; ALCARAZ, Francisco Abraham Rios; NESPECA, Maurílio Gustavo; RODRIGUES, Aline Varella; MOTTERAN, Fabrício; ADORNO, Maria Angela Tallarico; VARESCHE, Maria Bernadete A.; MAINTINGUER, Sandra Imaculada. Biohydrogen production in an integrated biosystem using crude glycerol from waste cooking oils. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 162, p. 701-711, dez. 2020a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.061>.

RODRIGUES, Caroline Varella; SANTANA, Kamili Oliveira; NESPECA, Maurílio Gustavo; RODRIGUES, Aline Varella; PIRES, Lorena Oliveira; MAINTINGUER, Sandra Imaculada. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 45, n. 21, p. 11943-11953, abr. 2020b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.168>.

ROSSI 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, Apr. 2011.

RUGGERI, Bernardo; TOMMASI, Tonia; SANFILIPPO, Sara. Effect of Temperature on Fermentative H₂ Production by HPB. In: RUGGERI, Bernardo. **BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion**: from research to full-scale applications. [Si]: Springer-Verlag London, 2015. Cap. 4. p. 65-83.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Hydrogen production by anaerobic fermentation - general aspects and possibility of using Brazilian agro-industrial wastes. **Química Nova**, v. 37, p. 857 – 867, 2014.

SANTOS, Samantha Christine et al. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 39, n. 18, p.9599-9610, jun. 2014a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.104>.

SANTOS, Samantha Christine; ROSA, Paula Rúbia Ferreira; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; VARESCHE, Maria Bernadete Amâncio; SILVA, Edson Luiz. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 39, n. 17, p. 9000-9011, jun. 2014b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.241>.

SANTOS, Samantha Christine; ROSA, Paula Rúbia Ferreira; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; VARESCHE, Maria Bernadete Amâncio; SILVA, Edson Luiz. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 159, p. 55-63, maio 2014c. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.051>.

SARMA, Saurabh Jyoti et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.6473-6490, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.050>.

SARMA, Saurabh Jyoti et al. Evaluation of different supplementary nutrients for enhanced biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 using waste derived crude glycerol. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 38, n. 5, p.2191-2198, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.110>.

SASAKI, Kengo; MORITA, Masahiko; SASAKI, Daisuke; NAGAOKA, Jun; MATSUMOTO, Norio; OHMURA, Naoya; SHINOZAKI, Hiraku. Syntrophic degradation of proteinaceous materials by the thermophilic strains *Coprothermobacter proteolyticus* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 112, n. 5, p. 469-472, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.07.003>.

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, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.144>

SCHUCHARDDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 199-210, Jan./Feb. 1998.

SEQUINEL, R. **Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por Headspace estático**. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

SHIN, H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 29, n. 13, p.1355-1363, out. 2004. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.011>.

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, Luís Carlos Matos da. **Processo de Produção de Biodiesel e Análise de Parâmetros de Qualidade**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Energias Renováveis e Eficiência Energética, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2014.

SILVA, F. M. S.; MAHLER, C. F.; OLIVEIRA, L. B.; BASSIN, J.P. 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, jun 2018. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.039>

SITTHIKITPANYA, Saruda; REUNGSANG, Alissara; PRASERTSAN, Poonsuk. Two-stage thermophilic bio-hydrogen and methane production from lime-pretreated oil palm trunk by simultaneous saccharification and fermentation. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.4284-4293, mar. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.063>.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15473 – 15482, 2012

SITTIJUNDA, Sureewan; REUNGSANG, Alissara. Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 42, n. 45, p. 27558-27569, nov. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.149>.

SITTIJUNDA, Sureewan; REUNGSANG, Alissara. 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**, [S.L.], v. 161, p. 361-372, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.053>.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; PARK, J. H.; PARK, J. H.; PARK, H. D.; YOON, J. J.; KIM, S. H. Feasibility of enriched mixed cultures obtained by repeated

batch transfer in continuous hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4393-4403, Feb. 2016.

SOLOMON, B.O. et al. Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.107- 117, abr. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)00148-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(94)00148-6).

STANDARD METHODS. Método 4500C, Semi-Micro-Kjeldahl Method. 22 ed.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 322-328, 2014.

TANDISHABO, Kalayi et al. Distribution and role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 114, n. 5, p. 518-520, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.023>.

TEMUDO, M.F.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: Impacts of the pH and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008,80, 1121–1130.

TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

VAN GINKEL, Steven; LOGAN, Bruce E.. Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 39, n. 23, p. 9351-9356, dez. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es0510515>.

VAN OOTEGHEM, Suellen A.; BEER, Stephen K.; YUE, Paul C. Hydrogen Production by the Thermophilic Bacterium *Thermotoga neapolitana*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Morgantown, Mv, v. 98, n. 2, p.177-189, fev. 2002.

VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 3, p. 1319-1331, Feb. 2013.

VIEIRA, Sara Silveira. **PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES UTILIZANDO CATALISADORES HETEROGÊNEOS ÁCIDOS**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

YANG, Yingnan; TSUKAHARA, Kenichiro; SAWAYAMA, Shigeki. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. *Process*

Biochemistry, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 362-367, abr. 2008. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.015>.

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

WATANABE; TADA; BABA; FUKUDAA; NAKAI. Enhancing methane production during the anaerobic digestion of crude glycerol using Japanese cedar charcoal. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 387-392, dez. 2013.

ZENG, A.-P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 169-175, 1996.

ZHANG, Tong; LIU, Hong; FANG, Herbert H.p.. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.149-156, out. 2003. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4797\(03\)00141-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4797(03)00141-5).

ZHANG, y; SHEN, J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.441-446, mar. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.05.006>.

ZHANG, F.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; DAI, K.; VAN LOOSDRECHT, M.; ZENG, R. Simultaneous production of acetate and methane from glycerol by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens in extreme-thermophilic (70 °C) mixed culture fermentation. **Applied Energy**, v. 148, p. 326 – 333, 2015.

ZHANG, Kun; CAO, Guang-li; REN, Nan-qi. Bioaugmentation with *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 to enhance thermophilic hydrogen production using corn stover hydrolysate. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 44, n. 12, p.5821-5829, mar. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.045>.

ZHENG, He-shan et al. Thermophilic hydrogen production from sludge pretreated by thermophilic bacteria: Analysis of the advantages of microbial community and metabolism. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 172, p.433-437, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.020>.

ANEXOS

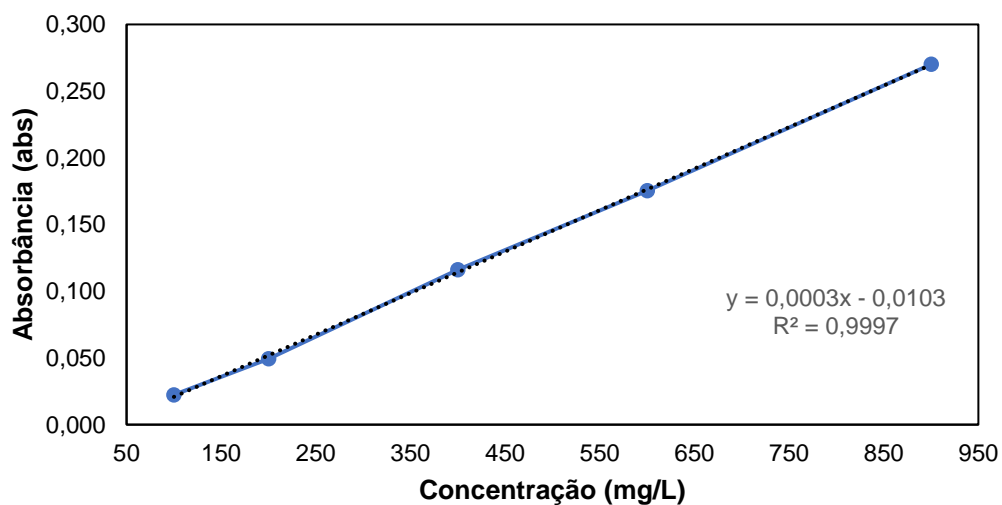
Anexo A

Curva de Calibração da Demanda Química de Oxigênio

Tabela A - Concentração, absorções e média da construção da curva de calibração

Concentrações (mg/L)	Absorbâncias (620nm)			Média	Desvio Padrão	DPR
100	0,023	0,021	0,023	0,022	0,0012	5%
200	0,048	0,050	0,050	0,049	0,0012	2%
400	0,116	0,118	0,114	0,116	0,0020	2%
600	0,180	0,173	0,173	0,175	0,0040	2%
900	0,275	0,267	0,268	0,270	0,0044	2%

Figura A – Curva de Calibração da DQO



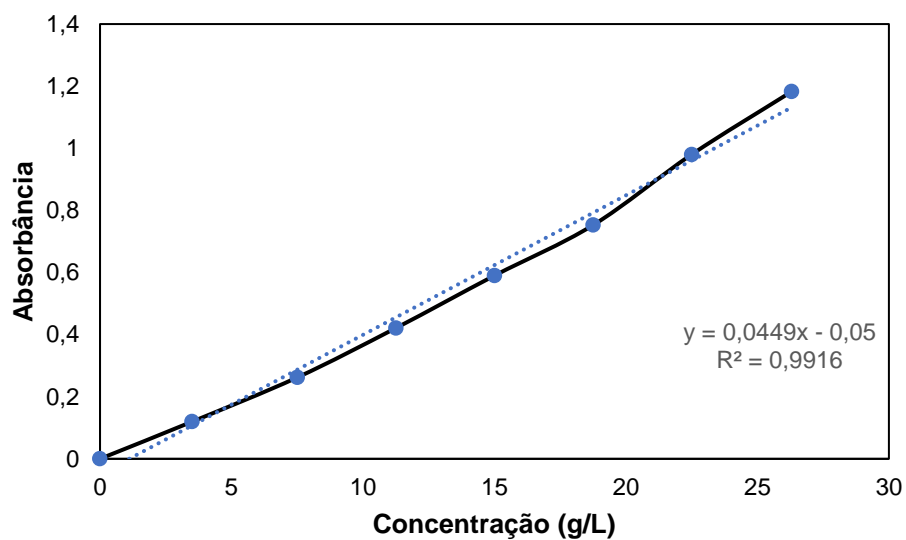
Anexo B

Curva de Calibração do Remoção de glicerol Livre

Tabela B – Concentração, absorções e média da construção da curva de calibração

Concentração (mg/L)	Abs 1	Abs 2	Média	Desvio
0	0	0	0	0
3,5	0,119	0,12	0,1195	0,001
7,5	0,26	0,264	0,262	0,003
11,25	0,418	0,424	0,421	0,004
15	0,587	0,593	0,59	0,004
18,75	0,753	0,752	0,7525	0,001
22,5	0,973	0,987	0,98	0,010
26,3	1,188	1,177	1,1825	0,008

Figura B – Curva de Calibração Remoção de glicerol



Anexo C

Curvas de Calibração Cromatografia Gasosa – Determinação da composição do biogás

Figura C.1 – Curva de Calibração do H₂

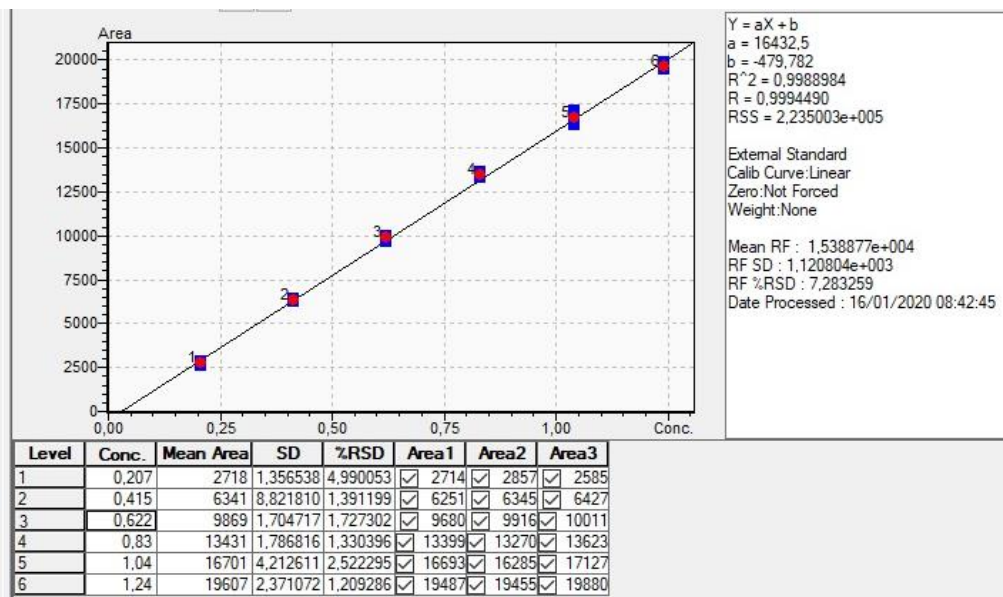


Figura C.2 – Curva de Calibração do N₂

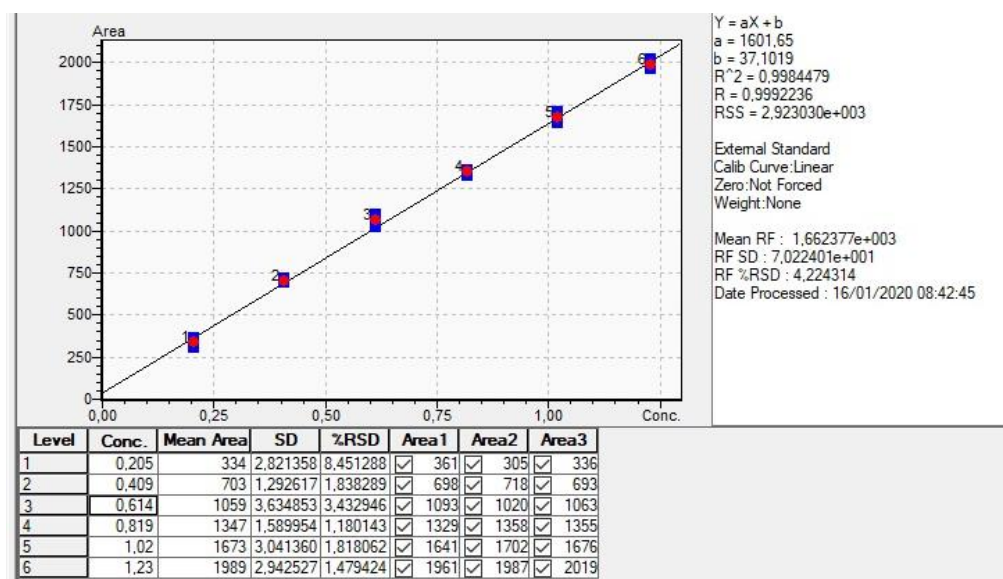
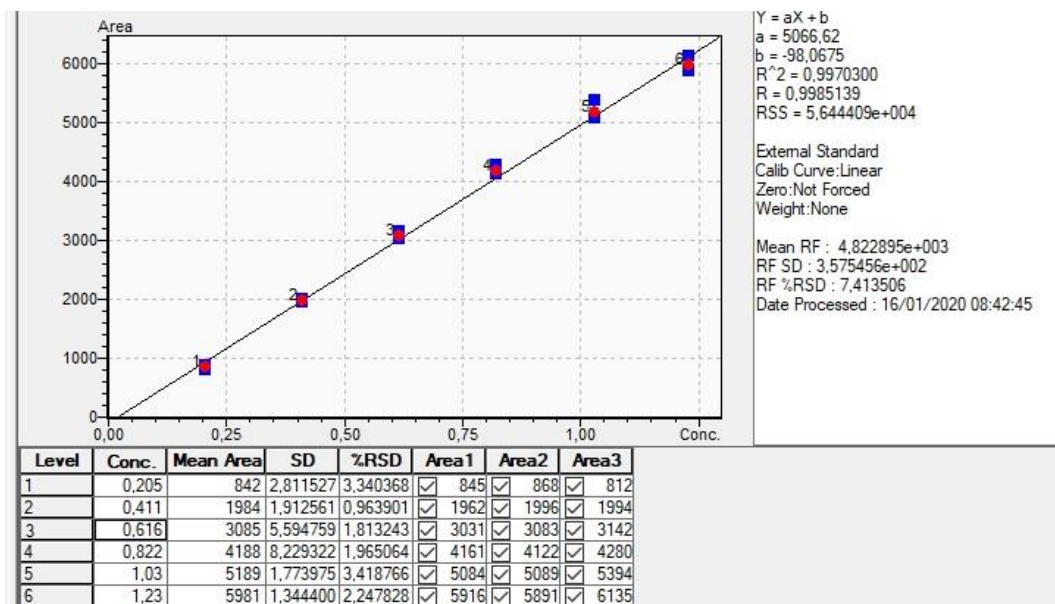


Figura C.3 – Curva de Calibração do CH₄

Anexo D

Curva de Calibração Cromatografia Gasosa – Determinação da composição de ácidos e álcoois

Tabela D.1 – Calibração dos álcoois

	metanol	etanol	acetona	n-propanol	n-butanol	1.3-propanodiol
Intercepção	1424913	2884499	4246771	7082725	8094175	237151
Inclinação	43545	147825	589381	362342	606513	71
R²	0,994	0,994	0,997	0,992	0,994	0,946
r	0,997	0,997	0,998	0,996	0,997	0,973
LQ (mg/L)	8,9	4,2	2,2	2,8	2,6	44,7
Área mínima	429243	871615	1610454	2079576	1966223	211616

Tabela D.2 – Calibração dos ácidos

	ác. propriônico	ác. isobutírico	ác. acético	ác. Isovalérico	ác. Capróico
Intercepção					
Inclinação	-523934	-443796	-230223	-1680103	-7831197
R²	11921	55360	2089	101432	223038
r	0,985	0,989	0,976	0,990	0,962
LQ (mg/L)	0,992	0,995	0,988	0,995	0,981
Área mínima	9,2	3,2	93,0	3,1	3,2
Intercepção	28363	60311	28308	367000	3515363

Anexo E

Tabela E.1 – Produção temporal de H₂ em reatores anaeróbios em batelada, a 55°C. Ensaio 1 e 2 operados respectivamente com inóculo 1 e inóculo 2, mantidos sob modo estático. Ensaio 3 e 4 operados respectivamente com inóculo 1 e inóculo 2 mantidos, a 120 rpm (Figura 10).

Tempo (h)	Ensaio 1 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Ensaio 2 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Ensaio 3 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Ensaio 4 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0
19	0,73±0,75	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0
25	9,59±4,01	3,45±5,98	0,00±0,0	0,00±0,0
43	24,77±2,83	9,36±5,41	5,00±4,38	10,36±2,87
67	34,49±3,95	14,82±3,58	8,27±2,84	14,27±3,40
91	37,27±3,94	18,82±3,88	10,77±2,84	14,27±0,0
96	-	18,82±0	-	-

Tabela E.2 – Produção temporal de H₂ dos reatores anaeróbios em batelada operados com inóculo 1 (termofílico) e inóculo 2 (mesofílico) sob diferentes condições termofílicas: ensaios 5 e 6 (45°C) e, ensaios 1 e 2 (55°C) (Figura 11).

Tempo 1	Ensaio 1 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Ensaio 2 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Tempo 2	Ensaio 5 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Ensaio 6 Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,0±0,0	0,00±0,0	0	0±0,0	0,00±0,0
3	5,39±0,3	0,96±1,7	2	2,79±0,4	2,45±0,5
5	5,39±0,0	2,93±1,6	4	2,79±0,0	2,45±0,0
7	6,70±1,2	2,93±0,0	6	3,20±0,7	2,45±0,0
9	9,53±2,2	3,53±0,8	8	8,69±0,9	2,45±0,0
26,5	24,82±7,2	16,16±1,1	23,5	21,18±1,0	24,78±6,2
28,5	28,15±3,3	17,01±0,9	25,5	22,92±1,5	28,34±0,5
31	34,10±1,3	19,85±3,3	27,5	24,75±0,8	30,34±0,8
33	38,01±1,5	20,44±1,0	29,5	26,34±0,3	32,51±0,5
50,5	43,86±5,1	21,23±1,4	31,5	27,92±0,6	34,54±0,6
52,5	44,40±0,9	21,64±0,4	48,5	34,14±0,4	40,69±1,1
54,5	44,40±0,0	21,64±0,0	50,5	34,14±0,0	42,27±0,6
56,5	44,40±0,0	21,64±0,0	52,5	35,16±0,2	43,55±0,6
			54,5	35,16±0,0	43,55±0,0

Tabela E.3 – Variação temporal do crescimento em reatores anaeróbios em batelada com o inóculo 3 (barras) e geração de hidrogênio (linha) (Figura 12).

Tempo (h)	Absorbância	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,2205	0,00
8	0,2555	0,00
24	1,209	31,91
48	1,34	44,93
72	1,236	50,03

Tabela E.4 - Variação temporal do pH durante o crescimento celular em reatores anaeróbios em batelada operados com o inóculo 3 (Figura 13).

Tempo (h)	pH
0	6
8	5,955
24	5,16
48	5,195
72	5,23

Tabela E.5 – Geração temporal de H₂ em reatores anaeróbios em batelada a alimentados com glicerol bruto em diferentes meios de cultivo (Figura 14)

Ensaio 8		Ensaio 9		Ensaio 10	
Tempo (h)	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Tempo (h)	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)	Tempo (h)	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0	0	0,00±0	0	0,00±0
8	4,64±0,6	3	4,45±0,3	8	0,00±0
24	13,05±1,2	20	17,82±7,4	24	34,32±8,9
48	15,43±0,3	22	22,25±0,4	48	42,41±8,0
72	15,43±0	27	27,75±0,6	72	43,51±1,18
96	15,43±0	43	33,58±1,6	96	43,51±0
		48	37,87±1,2		
		50	42,59±1,26		
		66	49,42±1,3		
		70	51,48±1,0		
		86	51,48±0		

Tabela E.6 - Variação temporal do pH nos ensaios 8, 9 e 10 (Figura 15).

	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
Tempo (h)	pH	pH	pH
0	5,5±0	5,5±0	6,06±0,03
8	5,57±0,11	5,525±0,01	6,06±0,03
24	5,46±0,24	5,32±0,03	5,48±0,10
48	5,37±0,14	5,495±0,02	5,82±0,16
72	5,4±0,15	5,705±0	5,86±0,13

Tabela E.7 – Produção acumulada de H₂ no Ensaio 11 (Figura 16)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0
8	1,00±0
12	8,45±3,5
15	8,45±0
19	9,75±0,5
38	15,75±4,0
43	21,20±3,0
46	26,25±3,0
62	27,95±2,4
66	28,90±1,3
72	28,90±0,0

Tabela E.8 – Produção acumulada de H₂ no Ensaio 12 (Figura 18)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0,0
3	6,95±0,9
6	7,13±0,2
22	7,34±0,3
29	7,34±0,0
46	11,56±0,2
48	12,79±0,0
50	12,79±0,0
52	14,49±0,8
70	16,61±0,8
72	16,61±0,0

Tabela E.9 – Produção acumulada de H₂ no Ensaio 13 (Figura 19)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0,0
3	5,45±0,8
6	6,61±1,6
22	7,70±1,5
29	7,70±0,0
46	22,70±1,9
48	30,20±0,9
50	33,88±1,1
52	37,22±0,5
70	39,74±0,8
72	39,74±0,0

Tabela E.10 – Produção acumulada de H₂ no ensaio 14 (Figura 20)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0,0
3	0,10±0,0
6	4,91±3,1
20	19,36±0,7
24	36,40±2,3
26	50,04±6,7
28	59,31±1,5
30	63,54±0,2
46	72,53±0,7
48	72,53±0,0
50	72,53±0,0

Tabela E.11 – Produção acumulada de H₂ no ensaio 15 (Figura 22)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0,0
6	2,36±2,6
20	18,15±6,1
23	34,26±2,9
26	57,27±3,4
29	80,84±3,0
44	99,14±4,7
47	113,36±3,9
50	126,18±3,4
53	131,23±5,4
68	141,94±2,6
71	141,94±0,0

Tabela E.12 – Produção acumulada de H₂ no ensaio 16 (Figura 24)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0,0
4	5,14±2,2
8	6,68±0,6
22	14,95±6,1
25	17,25±2,4
29	21,38±0,6
48	43,19±7,6
51	57,73±2,8
55	70,00±5,6
70	77,16±1,4
75	79,55±0,5
80	84,32±2,9
91	87,39±0,5
94	89,36±1,0
96	89,36±0,0
98	89,36±0,0

Tabela E.13 – Produção acumulada de H₂ no ensaio 17 (Figura 26)

Tempo	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
0	0,00±0,0
8	0,86±0,2
14	7,45±1,4
17	9,82±1,6
24	28,45±7,9
40	47,99±17,6
43	71,03±7,9
45	83,58±4,6
48	102,26±2,5
64	128,84±15,4
67	137,98±3,3
70	141,93±5,6
72	143,30±1,9
86	145,00±2,4
89	145,00±0,0
92	145,00±0,0

Anexo F**Tabela F** – Produção acumulativa de metano nos ensaios 18 a 21 (Figura 29)

Ensaio 18		Ensaio 19		Ensaio 20		Ensaio 21	
Tempo (dia)	Produção de CH ₄ (mmol CH ₄ L ⁻¹)	Tempo (dia)	Produção de CH ₄ (mmol CH ₄ L ⁻¹)	Tempo (dia)	Produção de CH ₄ (mmol CH ₄ L ⁻¹)	Tempo (dia)	Produção de CH ₄ (mmol CH ₄ L ⁻¹)
0	0,00±0	0	0,00±0	0	0,00±0	0	0,00±0
1	30,06±16,9	1	2,94±1,3	1	4,04±5,7	1	4,04±0,1
2	56,42±12,8	2	8,65±1,9	2	5,27±1,2	2	4,86±0,1
3	69,04±3,1	3	11,53±2,5	3	6,84±0,5	3	5,44±0,1
4	74,84±2,7	4	14,55±3,5	4	8,81±0,5	4	5,93±0,1
5	93,04±3,6	5	17,57±1,7	5	10,65±0,8	5	6,26±0,1
6	108,01±4,5	6	21,14±1,6	6	12,83±0,8	6	6,84±0,2
7	124,75±6,2	7	25,80±3,1	7	15,18±0,7	7	7,45±0,3
8	142,54±6,8	8	28,97±2,8	8	17,48±0,9	8	8,03±0,1
9	160,10±1,3	9	32,39±3,0	9	19,67±0,9	9	8,40±0,1
10	178,63±2,5	10	35,00±1,3	10	21,56±0,8	10	8,40±0,0
11	198,67±1,8	11	36,79±1,0	11	23,29±1,2	11	8,40±0,0
12	213,22±0,5	12	38,13±1,0	12	23,88±0,9		
13	219,67±0,6	13	39,26±0,6	13	24,44±0,7		
14	229,72±0,6	14	40,36±0,6	14	24,44±0,0		
17	229,72±0,6	15	41,45±0,2	15	24,44±0,0		
18	233,51±0,3						
19	233,51±0,0						