

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO



DANIELA DE LOS ANGELES DALMAO PEREYRA

**Cofermentação de glicerol e melão como alternativas para produção de
biocombustíveis e produtos de valor agregado**

Maceió
2019

DANIELA DE LOS ANGELES DALMAO PEREYRA

**Cofermentação de glicerol e melação como alternativas para produção de
biocombustíveis e produtos de valor agregado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena
Cavalcante de Amorim

Maceió
2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

P437c Pereyra, Daniela de los Angeles Dalmao.
Cofermentação de glicerol e melão como alternativas para produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado / Daniela de los Angeles Dalmao Pereyra. – 2019.
87 f. : il. color.

Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.
Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 75-87.

1. Hidrogênio. 2. Reator anaeróbio de leite fluidificado. 3. Melão de cana-de-açúcar. 4. Glicerol bruto. 5. Biocombustíveis. I. Título.

CDU: 661.96



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO DO PPGRHS

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezenove às catorze horas e trinta minutos, na sala de aula do LCCV/CTEC, realizou-se a defesa de dissertação de mestrado, intitulada Co-fermentação de glicerol e melaço como alternativas para produção de bicomcombustíveis e produtos de valor agregado, de autoria do(a) aluno(a) Daniela de los Angeles Dalmao Pereyra, como requisito parcial para o título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento, na área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim (Orientador – PPGRHS/CTEC/UFAL), Prof.ª Dr.ª Karina Ribeiro Salomon (Examinadora Interna - PPGRHS/CTEC/UFAL), Prof.ª Dr.ª Daniele Vital Vich (Examinadora externa – CTEC/UFAL) e Prof.ª Dr.ª Méliida del Pilar Anzola Rojas (Examinadora Externa - USP). Após o encerramento da defesa, em reunião confidencial, a banca examinadora, com base no regimento interno do PPGRHS, decidiu por:

- Aprovação integral da dissertação;
- Aprovação da dissertação, condicionada às correções indicadas pela banca, sendo concedido o prazo de 45 dias para o (a) candidato (a) efetuar as correções sugeridas pela banca examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, sob pena de não expedição de diploma;
- Reprovação da dissertação, com indicação de nova defesa, sendo concedido o prazo de dias para o (a) candidato (a) realizar nova defesa;
- Reprovação da dissertação.

As atividades descritas nesta ata são requisitos parciais para a expedição do Diploma.

E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim
(Orientador – PPGRHS/CTEC/UFAL)

Prof.ª Dr.ª Karina Ribeiro Salomon
(Examinadora Interna - PPGRHS/CTEC/UFAL)

Prof.ª Dr.ª Daniele Vital Vich
(Examinadora Externa – CTEC/UFAL)

Prof.ª Dr.ª Méliida del Pilar Anzola Rojas
(Examinadora Externa - USP)

RESUMO

Subprodutos da produção de biocombustíveis como glicerol bruto e melão de cana-de-açúcar são fontes de carbono interessantes para a produção biológica de hidrogênio por meio da digestão anaeróbia. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar com a cofermentação destes dois substratos em um reator anaeróbio de leito fluidificado com o objetivo de biocombustíveis e produtos de valor agregado. O reator utilizado possuía volumes total e útil de 1,2 e 0,945 L, respectivamente. A fonte de micro-organismos empregada foi lodo de um reator tipo UASB de uma estação de tratamento de esgoto. O material suporte utilizado para garantir a adesão microbiana foi pneu triturado. Foram analisadas diferentes proporções de alimentação do reator, mantendo o melão constante (4 g.L^{-1}) e variando o glicerol bruto (1 g.L^{-1} , 2 g.L^{-1} , 3 g.L^{-1} e 0 g.L^{-1}) com um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 horas. O maior rendimento médio de hidrogênio ocorreu na quarta fase de operação (sem glicerol bruto) – $3,77 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$, enquanto a maior produção volumétrica média de hidrogênio foi obtida quando se retirou o glicerol da alimentação do reator – $0,34 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$. Os principais metabólitos solúveis produzidos foram o 1,3-propanodiol (14,43 a 38,81%) e os ácidos acético (13,25 a 26,89%) e propiônico (12,11 a 37,46%).

Palavras-chave: Hidrogênio, reator anaeróbio de leito fluidificado, melão, glicerol bruto.

ABSTRACT

Byproducts of biofuel production such as raw glycerol and sugarcane molasses are interesting carbon sources for biological hydrogen production through anaerobic digestion. Thus, the objective of this work was to evaluate with the cofermentation of these two substrates in an anaerobic fluidized bed reactor in order to produce biofuels and value added products. The reactor used had total and useful volumes of 1.2 and 0.945 L, respectively. The source of microorganisms employed was sludge from a UASB reactor from a sewage treatment plant. The support material used to ensure microbial adhesion was shredded tire. Different reactor feed ratios were analyzed, keeping molasses constant (4 g.L^{-1}) and varying crude glycerol (1 g.L^{-1} , 2 g.L^{-1} , 3 g.L^{-1} and 0 g.L^{-1}) 4 hour hydraulic retention time (HRT). The highest average hydrogen yield occurred in the fourth phase of operation (without crude glycerol) - $3.77 \text{ mol}_{\text{H}_2}.\text{mol}_{\text{glycose}}^{-1}$, while the highest average hydrogen volume production was obtained when the glycerol was removed from the reactor feed - $0.34 \text{ L}_{\text{H}_2}.\text{L}^{-1}_{\text{reactor}}.\text{h}^{-1}$. The main soluble metabolites produced were 1,3-propanediol (14.43 to 38.81%) and acetic (13.25 to 26.89%) and propionic acids (12.11 to 37.46%).

Key-words: Hydrogen, fluidized bed anaerobic reactor, molasses, crude glycerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma simplificado do processo produtivo de etanol e açúcar.	22
Figura 2 – Fluxograma do processo produtivo do biodiesel.	29
Figura 3 – Principais setores industriais de aplicação da glicerina.	30
Figura 4 – Fluxograma das atividades desenvolvidas durante o estudo.	41
Figura 5 – Reator CSTR utilizado para produção do biodiesel.	44
Figura 6 - Separação biodiesel e glicerol bruto.	44
Figura 7 – Esquema de instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.	48
Figura 8 - Perfil de dependência do pH ao longo da operação do RALF.	58
Figura 9 - Perfil de dependência de cada fase com a variação de DQO afluente e efluente e a sua eficiência de remoção no RALF.	60
Figura 10 - Perfil de dependência de cada fase com a variação de Carboidrato afluente novo e efluente e a sua eficiência de remoção no RALF.	61
Figura 11 - Porcentagens médias de sólidos suspensos fixos e voláteis nos efluentes do RALF verificados ao longo das fases operacionais.	63
Figura 12 – Rendimento de hidrogênio no RALF ao longo das fases operacionais.	65
Figura 13 – Perfil de dependência da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) ao longo do tempo de operação.	66
Figura 14 – Produção volumétrica de hidrogênio no RALF ao longo das fases operacionais.	67
Figura 15 – Perfil de dependência do conteúdo de H ₂ ao longo do tempo de operação.	68
Figura 16 – Conteúdo do biogás produzido no RALF ao longo das fases operacionais.	69
Figura 17 – Perfil de dependência da concentração molar média dos metabólitos solúveis produzidos no RALF ao longo do tempo operacional.	72
Figura 18 – Metabólitos solúveis produzidos no RALF ao longo das fases operacionais.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	15
Tabela 2 - Caracterização do melão de cana-de-açúcar pela literatura.....	26
Tabela 3 - Produção de hidrogênio com melão como substrato.....	27
Tabela 4 – Caracterização do glicerol bruto pela literatura.....	35
Tabela 5 - Produção de hidrogênio com glicerol como substrato.....	36
Tabela 6 – Continuação - Produção de hidrogênio com glicerol como substrato.....	37
Tabela 7 - Etapas de operação do reator.....	49
Tabela 8 – Meio nutricional Del Nery adaptado.....	50
Tabela 9 – Análises e monitoramento do reator.....	51
Tabela 10 – Caracterização do melão bruto.....	54
Tabela 11 – Caracterização do glicerol bruto.....	56
Tabela 12 – Condições operacionais do RALF durante as três primeiras fases operacionais..	57
Tabela 13 - Médias e desvios padrões de DQO afluente e efluente e de eficiência de remoção.	60
Tabela 14 - Médias e desvios padrões de carboidrato afluente e efluente e de eficiência de remoção.....	61
Tabela 15 - Variação da concentração de SST, SSF e SSV no afluente e no efluente durante a operação do reator.....	62
Tabela 16 – Valores médios do rendimento de hidrogênio (HY) em cada fase operacional. ..	65
Tabela 17 - Valores médios da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) em cada fase operacional.....	67
Tabela 18 – Valores médios e desvios padrões da composição percentual do biogás produzido no RALF em cada fase operacional.....	69
Tabela 19 – Concentrações médias dos metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada fase operacional.....	70
Tabela 20 – Concentração molar e porcentagem dos metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada fase operacional.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnsBBR – *Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor* (reator anaeróbio operado em batelada sequencial com biomassa imobilizada)

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EGSB – *Expanded Granular Sludge Bed* (reator granular de leito expandido)

HY – Rendimento de hidrogênio

HPR – Produção volumétrica de hidrogênio

HAc – Ácido Acético

HPr – Ácido Propiônico

NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl

RALF – Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

SMP – Metabólitos totais produzidos

SSF – Sólidos Suspensos Fixos

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

TCO – Taxa de Carregamento Orgânico

TDH – Tempo de Detenção Hidráulica

UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente)

V_{mf} – Velocidade mínima de fluidificação

1,3-PDO – 1,3-propanodiol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS E METAS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Produção Biológica de Hidrogênio.....	15
3.2 Digestão anaeróbia e rotas metabólicas.....	16
3.3 Fatores que influenciam a produção anaeróbia de hidrogênio.....	19
3.4 Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.....	21
3.5 Melaço de cana-de-açúcar.....	21
3.6 Glicerol bruto.....	28
3.6.1 Impurezas e pré-tratamento do glicerol bruto.....	38
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Substratos.....	42
4.1.1 Melaço.....	42
4.1.2 Glicerol Bruto.....	42
4.2 Caracterização dos substratos.....	45
4.2.1 Caracterização do melaço.....	46
4.2.2 Caracterização do glicerol bruto.....	46
4.3 Inóculo.....	46
4.4 Material Suporte.....	46
4.5 Reator anaeróbio de leito fluidificado.....	47
4.6 Montagem e inoculação do reator.....	48
4.7 Condições operacionais.....	49
4.8 Suplementação nutricional.....	50
4.9 Análises físico-químicas e monitoramento.....	50
4.9.1 Análise da composição do biogás.....	51
4.9.2 Análise dos metabólitos solúveis.....	52
4.10 Cálculo dos principais parâmetros.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Caracterização dos substratos.....	54
5.1.1 Caracterização do melaço.....	54

5.1.2 Caracterização do glicerol bruto.....	56
5.2 Monitoramento do RALF.....	57
5.3 Remoção da DQO.....	59
5.4 Conversão de Carboidratos.....	60
5.5 Determinação de Sólidos Suspensos.....	62
5.6 Produção de Hidrogênio.....	63
5.6.1 Rendimento de Hidrogênio (HY).....	63
6.2 Produção volumétrica de hidrogênio (HPR).....	65
5.6.3 Composição do biogás produzido no RALF.....	67
5.7 Composição dos metabólitos solúveis no efluente.....	69
6 CONCLUSÃO.....	73
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

No cenário do desenvolvimento sustentável mundial, para cumprir a Agenda 2030 da ONU, é necessário aumentar substancialmente a participação de energias renováveis na matriz energética e reforçar a cooperação internacional para facilitar o acesso à pesquisa de tecnologias de energia limpa (UNIC RIO, 2015). Sob essa visão, no Brasil o programa RenovaBio tem como objetivo aumentar a valorização dos biocombustíveis e incentivar o investimento em estudos da sua capacidade de produção, assim impulsionando a utilização de energias limpas no país, que ainda é muito dependente de combustíveis líquidos fósseis (PIRES, 2017).

Esse setor de combustíveis renováveis ganhou impulso no Brasil com a lei nº 13.263/2016, a qual estabelece que o percentual obrigatório de adição de biodiesel ao diesel comum deve crescer de 8 para 9% em 2018, com possibilidade de elevação do percentual na mistura para até 15% em 2019 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA/CASA CIVIL, 2016). Além disso, o Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool (CIMA) fixou, por meio da portaria nº 75 de 5 de março de 2015, o percentual obrigatório de adição de etanol anidro combustível à gasolina de 27% na gasolina comum e de 25% na gasolina *premium* (ABREU, 2015).

Com o incentivo da produção de biodiesel, é importante observar que, segundo Chatzifragkou (2012), para cada 100 kg de biodiesel produzidos, são gerados cerca de 10 kg de glicerol bruto como subproduto. A depender da tecnologia da usina de biodiesel, assim como da natureza do óleo utilizado como matéria-prima, esses resíduos de glicerol podem conter vários tipos de impurezas, tais como metanol, sais, sabão, metais pesados e ácidos graxos residuais (CHI et al., 2007; PYLE; GARCIA; WEN, 2008; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2009; CHATZIFRAGKOU et al., 2010; CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012). Este fato muitas vezes torna o glicerol não lucrativo para purificação, principalmente quando se trata de usinas de biodiesel de pequeno e médio porte, e cujo objetivo é ser utilizado como componente em indústrias alimentícias, farmacêuticas ou de cosméticos (PAGLIARO; ROSSI, 2010).

Assim, o potencial da valorização do glicerol bruto sem etapas adicionais de tratamento e purificação é considerado um desafio para contornar a quantidade deste resíduo que vem sendo gerada (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012). Uma vez que o glicerol se apresenta como uma excelente fonte de carbono, este efluente pode ser utilizado em processos fermentativos de digestão anaeróbia para a produção de gás hidrogênio – um combustível que

não gera emissões nocivas ao ambiente em sua combustão (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012; YANG; HANNA; SUN, 2012; MARU et al., 2013; SARMA et al., 2013).

Já com o estímulo para a fabricação de etanol, é importante destacar que ao utilizar o melaço como sua matéria-prima, se gera vinhaça como subproduto, um efluente com carga poluente que pode provocar grande impacto ambiental ao ser descartado na natureza (SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011; DOS REIS et al., 2015).

Segundo Park (2010), o melaço se destaca comercialmente entre os substratos orgânicos por ser um subproduto economicamente viável no processo de refinação do açúcar – 40 a 60 kg por tonelada de cana-de-açúcar processada (PIACENTE, 2005), além de conter elevadas concentrações de açúcares como glicose, sacarose e frutose, ademais de nutrientes minerais, que o tornam um substrato interessante para a produção biológica de hidrogênio (JIMÉNEZ; BORJA; MARTÍN, 2004; PARK et al., 2010; BEHERA; MOHANTY; RAY, 2012; WANG; LI; REN, 2013; LEE; WEE; CHO, 2014). Normalmente, é utilizado para a produção de etanol, cachaça, rum, fermentos biológicos e rações animais (SILVA, 2008; JÚNIOR, 2013; WANG; LI; REN, 2013).

Entre os metabólitos que podem ser gerados a partir da fermentação do melaço e do glicerol, destacam-se o 1,3-propanodiol e o ácido propiônico. O 1,3-propanodiol é utilizado na fabricação de cosméticos, lubrificantes e remédios, sendo também utilizado na manufatura de polímeros – como poliésteres, poliéteres e poliuretanos – e na síntese de compostos heterocíclicos (MENZEL; ZENG; DECKWER, 1997; BIEBL et al., 1999). Já o ácido propiônico e seus sais de cálcio, sódio e potássio são comumente aplicados como conservantes de alimentos para humanos e em rações animais, e é também utilizado a síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos (HARADA, 2012).

Dos reatores utilizados na literatura para a produção biológica de hidrogênio, o reator anaeróbico de leito fluidificado contém um leito com partículas inertes – material suporte – de pequenas dimensões que é submetido a um fluxo ascendente para provocar fluidificação (LEME, 2010). Nele, o filme microbiano é retido por meio da adesão natural dos microorganismos às partículas de suporte sólidas, sendo interessante utilizar materiais suporte que, além de possuírem baixa densidade, baixo custo e serem de fácil aquisição, possam contribuir para solucionar o grave problema ambiental atual da geração de resíduos sólidos e sua

destinação inadequada (BARROS, 2012). Assim, o material suporte utilizado neste trabalho foi pneu triturado.

Este tipo de reator foi escolhido por apresentar diversas vantagens em relação a outras configurações de reatores, entre as quais se destacam: retenção de grande quantidade de biomassa que cresce aderida ao material suporte, menor queda de pressão que sistemas de leito fixo – além de não ter problemas de obstrução de leito, demanda pequeno volume na configuração do reator e apresenta baixa resistência no transporte de massa externo quando comparado a outros tipos de reator (FUENTES et al., 2009).

Neste contexto em que foram estudados dois subprodutos da indústria de biocombustíveis, e seu potencial para a digestão anaeróbia, surge a ideia de utilizá-los como cosubstratos. A produção de hidrogênio com a utilização de um cosubstrato é viável para superar os inconvenientes da monodigestão, pois dilui compostos tóxicos, equilibra nutrientes, incentiva a sinergia entre micro-organismos e aumenta a matéria orgânica biodegradável (XIA et al., 2012; ALBANEZ et al., 2016).

Com isso, para incentivar a demanda de energias renováveis na nossa matriz energética, este trabalho uniu dois subprodutos dessa indústria. O glicerol bruto possui baixa concentração de carboidratos e de nutrientes como fósforo e nitrogênio em sua composição, o que o leva a não produzir significativas quantidades de hidrogênio como substrato isolado. Já o melaço é rico em carboidratos e apresenta concentrações significativas de fósforo e nitrogênio em sua composição, tendo se apresentado como excelente produtor de hidrogênio na literatura. Dessa forma, esta pesquisa avaliou a cofermentação de melaço e glicerol bruto em um reator anaeróbio de leito fluidificado com o objetivo de produzir biocombustíveis e produtos de valor agregado.

2 OBJETIVOS E METAS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado em um reator anaeróbio de leito fluidificado através da cofermentação de melaço de cana-de-açúcar e glicerol bruto.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e tratar o glicerol bruto a ser utilizado como substrato no reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF);
- Avaliar diferentes proporções de melaço e glicerol durante a produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado em RALF operado sob condições mesofílicas;
- Avaliar a composição dos metabólitos solúveis (ácidos e álcoois) e gasosos (H_2 e CO_2) produzidos durante a operação do reator.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção Biológica de Hidrogênio

Aproximadamente 80% da demanda energética mundial é proveniente de combustíveis fósseis, que além de esgotáveis, liberam em suas reações de queima diversos compostos causadores do efeito estufa, além de chuvas ácidas e poluição. Assim, é cada vez mais imprescindível a pesquisa e o investimento em fontes de energia renováveis que causem nenhum ou o mínimo impacto ambiental possível (RAHMAN et al., 2016).

O hidrogênio (H_2) é uma fonte de combustível limpa, renovável. Em sua queima, produz somente água como subproduto ao reagir com o oxigênio em células combustíveis, ou seja, não coopera com a emissão de poluentes atmosféricos particulados. O H_2 possui alto teor energético, sendo uma ótima fonte de combustível – se for financeiramente viável – para substituir energia proveniente de combustíveis fósseis. Sua utilização pode ser uma opção interessante para sustentar o contínuo crescimento da demanda global sem agravar a questão do aquecimento climático (MIZUNO et al., 2000; LEITE et al., 2008; WU; ZHU; MILLER, 2013).

A capacidade energética do hidrogênio é superior à dos combustíveis fósseis (142 kJ.g^{-1}), e sua eficiência como combustível automotivo é 50% superior à da gasolina (VASCONCELOS; LEITÃO; SANTAELLA, 2016). Na Tabela 1, a seguir, pode ser vista a superioridade do poder calorífico do hidrogênio comparado a outros combustíveis (NAZARETH, 2015):

Tabela 1 – Poder calorífico de diferentes combustíveis.

Combustível	Poder calorífico superior (kJ.g^{-1})	Poder calorífico inferior (kJ.g^{-1})
Hidrogênio	141,86	119,93
Metano	55,53	50,02
Propano	50,36	45,60
Gasolina	47,50	44,50
Etanol	30,57	27,71
Metanol	19,96	18,05

Valores a 25°C e 1 atm.

Fonte: Nazareth (2015).

Os métodos de produção de H₂ podem ser divididos em função das três matérias-primas mais utilizadas – combustíveis fósseis, água e biomassa. Os principais métodos que empregam combustíveis fósseis para gerar hidrogênio são a reforma a vapor do gás natural, a oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e a gaseificação do carvão. As maiores desvantagens destes processos são os impactos ambientais e os riscos aos operários nas usinas (NAZARETH, 2015).

Entre os métodos em que a matéria-prima é a água, os destaques são a eletrólise, processos foto-eletrouímicos e termoquímicos. Já com biomassa como matéria-prima, os métodos adotados são processos biológicos – biofotólise da água, foto-fermentação e fermentação anaeróbia -, gaseificação da biomassa, reforma a vapor do etanol e reforma em fase líquida. Os processos biológicos tem ganhado destaque, pois estes unem o tratamento de águas residuárias à geração de fontes de energia alternativas (NAZARETH, 2015).

3.2 Digestão anaeróbia e rotas metabólicas

A digestão anaeróbia é um processo biológico natural que ocorre na ausência de oxigênio molecular. Nele, um consórcio microbiano – bactérias e arqueias – interage entre si em um processo de fermentação estável e autorregulado, no qual matéria orgânica biodegradável é convertida principalmente em dióxido de carbono e metano por meio de vias metabólicas complexas que ocorrem em etapas sequenciais (MOSEY, 1983).

O processo da digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas – hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese – podendo ainda ter a sulfetogênese. O hidrogênio é produzido nas segunda e terceira etapas, as quais constituem a fermentação e é consumido na metanogênese por arqueias metanogênicas que utilizam dióxido de carbono e hidrogênio para produzir metano (VASCONCELOS; LEITÃO; SANTAELLA, 2016).

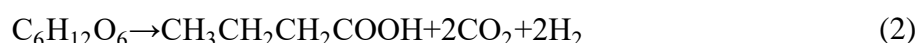
As principais bactérias fermentativas responsáveis pela produção de gás hidrogênio são: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* e *Escherichia coli*. Dentre essas, as espécies de *Clostridium* produzem maiores rendimentos de hidrogênio que bactérias aeróbias facultativas, como as *Enterobacter* (PEIXOTO, 2011). Os micro-organismos que mais produzem hidrogênio durante a etapa da acidogênese são *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (BARROS, 2009).

No caso do substrato glicose, as principais rotas fermentativas para a produção de hidrogênio são as conversões da glicose em acetato, ácido butírico e etanol, sendo que nesta última há duas rotas possíveis, e em uma delas há produção simultânea de etanol e hidrogênio (ZHU et al., 2009). Bactérias homoacetogênicas que tenham sobrevivido ao pré-tratamento do inóculo podem consumir hidrogênio para produzir acetato, o que diminui o rendimento de hidrogênio. Outra rota que pode diminuir o rendimento de hidrogênio é a fermentação do propianato (BARCA et al., 2015). Já o ácido láctico é produzido a partir da glicose através de três rotas metabólicas (AMORIM, 2009). As equações das rotas fermentativas estão listadas a seguir:

- Produção de ácido acético:



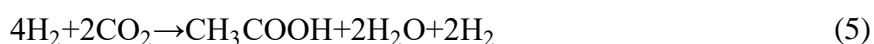
- Produção de ácido butírico:



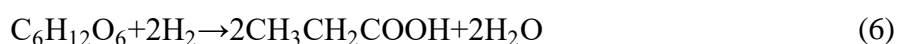
- Produção de etanol:



- Produção de ácido acético a partir de bactérias homoacetogênicas:



- Produção de ácido propiônico:



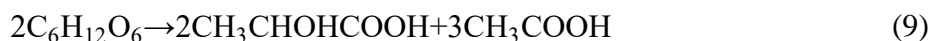
- Produção de ácido láctico por rota homofermentativa:



- Produção de ácido láctico por rota heterofermentativa:



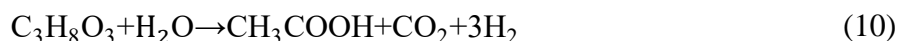
- Produção de ácido lático por rota bifidum:



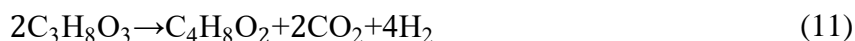
Já o glicerol pode ser degradado por duas vias metabólicas, a oxidativa e a redutiva. Na oxidativa o glicerol é inicialmente convertido em piruvato, e este pode formar ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, 2,3-butanodiol, butanol, etanol, hidrogênio e gás carbônico. Por outro lado, na redutiva o glicerol produz apenas 1,3-propanodiol (TEMUDO et al., 2008; REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013).

A produção do gás hidrogênio a partir do glicerol se dá pela conversão do substrato em ácido acético, ácido butírico, butanol e etanol (SARMA et al., 2012; MARU et al., 2013), enquanto sua conversão em ácido propiônico não produz hidrogênio (WANG; LI; REN, 2013), como pode ser visto nas rotas fermentativas nas Equações 10 a 14, a seguir:

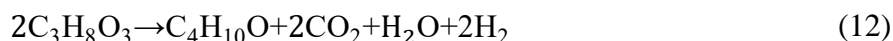
- Produção de ácido acético:



- Produção de ácido butírico:



- Produção de butanol:



- Produção de etanol:



- Produção de ácido propiônico:



Uma rota fermentativa que consome o hidrogênio, por sua vez, é o da conversão do glicerol em 1,3-propanodiol (Equação 15) intermediário de valor agregado, este álcool é

amplamente utilizado na indústria de polímeros para produzir poliésteres e poliuretanos (KIVISTÖ; SANTALA; KARP, 2012).

- Produção de 1,3-propanodiol:



3.3 Fatores que influenciam a produção anaeróbia de hidrogênio

Alguns parâmetros como pH, temperatura, tratamento de inóculo, substrato, tempo de detenção hidráulica e taxa de carregamento orgânico são bastante significativos para a produção de hidrogênio por digestão anaeróbia.

Bactérias acidogênicas preferem intervalos de pH entre 5,5 e 6,5. Valores muito abaixo ou acima dessa faixa minimizam a produção de hidrogênio (NUALSRI; KONGJAN; REUNGSANG, 2016). Já o pH neutro favorece a metanogênese, de forma que bactérias metanogênicas aumentam a produção de metano quando o pH está entre 6,5 e 7,5 – consumindo o hidrogênio para isso (OHIMAIN; IZAH, 2017). Dessa forma, a faixa de pH entre 5,5 e 6,5 é relatada como ideal para evitar a metanogênese, e ambientes muito ácidos – pH abaixo de 4,5 – inibem a atividade das enzimas produtoras de H₂ (PEIXOTO, 2011; BHARATHIRAJA, 2016).

Contudo, indo contra esses valores mínimos de pH comumente publicados pela literatura até então, Zaiat et al. (2017) desenvolveram um trabalho em que um reator UASB acidogênico apresentou produção de hidrogênio de longo prazo, de forma estável e com rendimentos satisfatórios, sendo o rendimento máximo de $3,4 \pm 0,7 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sucrose}}$, com um pH médio de apenas 2,7 (MOTA et al., 2018).

Nota-se, ainda, que não há uma faixa de pH ótima para a produção de hidrogênio. Alguns autores na literatura relatam valores entre 4 e 9, mas a maioria dos seus estudos foi realizada em reatores em batelada, havendo ainda carência de estudos em reatores operados de forma contínua (AMORIM, 2012).

A temperatura é um fator que influencia o crescimento microbiano, as vias metabólicas e a atividade enzimática. Bactérias acidogênicas costumam crescer em condições mesofílicas (30 a 35°C) ou termofílicas (50 a 60°C), mas há também registros de espécies capazes de sobreviver em baixas temperaturas (KARADAG et al., 2014).

A produção anaeróbia de hidrogênio é também influenciada pelo tipo de inóculo e seu tratamento, uma vez que os produtos finais da fermentação dependem da cultura microbiana (ELSHARNOUBY et al., 2013). O emprego de uma cultura mista de micro-organismos exige a inibição das bactérias consumidoras de H₂, de forma que a importância do pré-tratamento do inóculo a ser utilizado no reator se dá por ser um método de reduzir essas espécies (LAMAISON et al., 2014).

Os métodos de pré-tratamento de inóculo mais utilizados são o ácido – que consiste em ajustar o pH para 3 durante um período de 24h – e o térmico, que consiste em aumentar a temperatura em uma faixa de 90 a 105°C durante 10 a 120 minutos. Tais métodos são eficientes porque as bactérias produtoras de hidrogênio são geralmente formadoras de esporos, sendo capazes de sobreviver em condições adversas de acidez e temperaturas elevadas, enquanto as bactérias consumidoras de hidrogênio geralmente não formam esporos (BARCA et al., 2015).

Outro parâmetro importante é o substrato, visto que para se obter um rendimento de hidrogênio satisfatório é necessário que o substrato tenha quantidade significativa de matéria orgânica. Neste sentido, muitos resíduos industriais são utilizados como fonte de carbono para a produção de hidrogênio, sendo que cada substrato exige a seleção individual de condições ótimas e nutrientes (PAWAR; VAN NIEL, 2013; URBANIEC; BAKKER, 2015).

O tempo de detenção hidráulica corresponde ao tempo em que o líquido permanece no reator e, portanto, afeta a eficiência da absorção do substrato, a população microbiana e as vias metabólicas (NUALSRI; KONGJAN; REUNGSANG, 2016). O uso de TDHs baixos ajuda a restringir o crescimento de arqueias metanogênicas, o que beneficia a produção de H₂ (BHARATHIRAJA, 2016).

Já a taxa de carregamento orgânico relaciona a concentração de substrato com o TDH utilizado no reator. As taxas de carregamento orgânico, ao atingir certo limite – entre 150 kg.m³/dia e 200 kg.m³/dia, sobrecarregam o sistema, e causam um declínio na produção de hidrogênio, como atestado por Barros (2009). Amorim (2009) observou a relação da aplicação de diferentes taxas de carregamento orgânico com a produção volumétrica de hidrogênio em vários reatores anaeróbios de leito fluidificado. Sua conclusão foi que, ao aumentar a TCO, a produção de H₂ aumentava, mas com valores próximos de 150 kg.m³/dia (aumento de 84,32 a 140,1 kg.m³/dia no R2CA), seu rendimento caiu de 1,90 para 1,24 mol_{H₂}/mol_{glicose}.

3.4 Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

O reator do tipo anaeróbio de leito fluidificado (RALF) consiste em um vaso cilíndrico contendo meio suporte inerte. Seu sistema se caracteriza pela capacidade de reter grandes quantidades de biomassa, assim, mesmo com aplicação de elevadas cargas hidráulicas, é possível manter um elevado tempo de retenção de sólidos. O RALF é compacto, tendo volume bastante inferior aos reatores anaeróbios de crescimento suspenso, mas possui elevado grau de estabilização de lodo. Neste tipo de reator, o meio é fluidificado pela velocidade ascendente do líquido criada pelas taxas de escoamento de alimentação e recirculação. A eficácia de separação do líquido, biogás e sólido é garantida pela presença de um separador no topo do reator (BARROS, 2009).

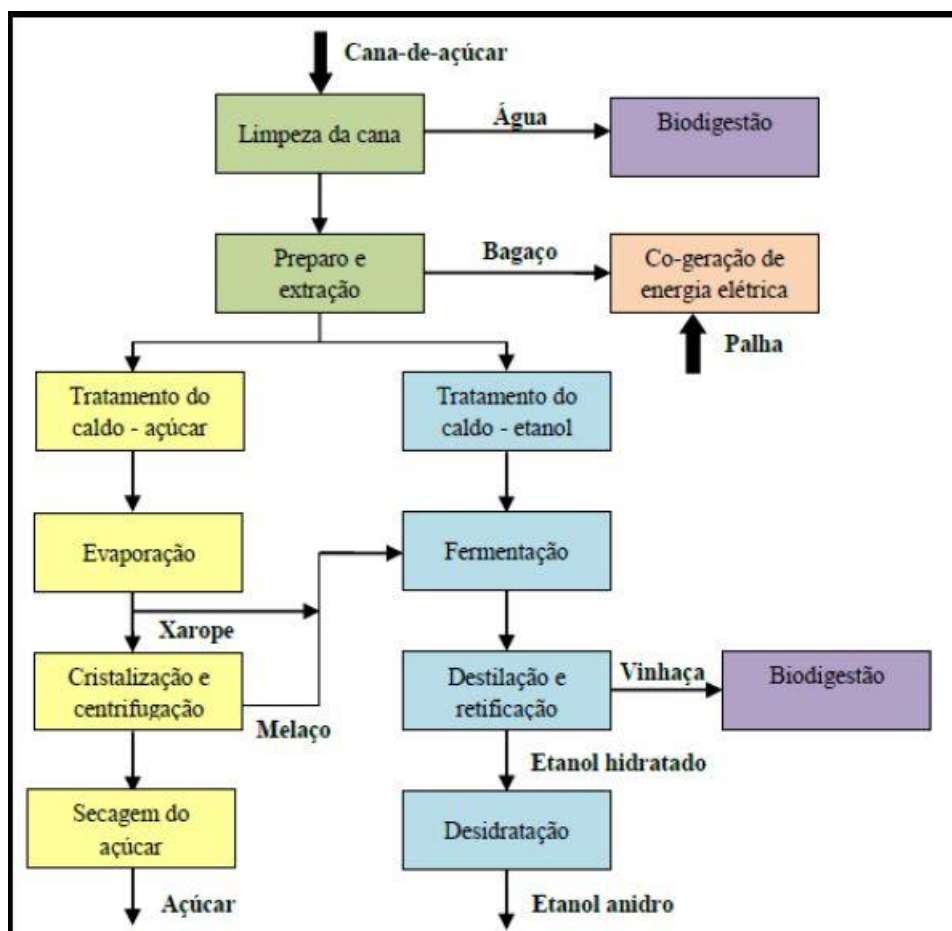
Vantagens dos reatores do tipo RALF são o acúmulo de grande quantidade de biomassa que cresce aderida ao meio suporte, suportando elevadas taxas de carregamento orgânico – TCO máximas de 2012,37 kg.m³/dia (R25SA) e 224790 kg.m³/dia (R25CA) (AMORIM, 2009), possibilidade de aplicação de baixos tempos de detenção hidráulica (TDH) – 0,5h e 0,76h (PARANHOS, 2016; LOPES; RAMOS; SILVA, 2017), por exemplo – e boas características de mistura, o que otimiza a transferência de massa entre substrato e micro-organismos, além de promover alta velocidade de agitação na fase líquida (AMORIM, 2009).

Além disso, trata-se de um reator de fácil controle e automação e é possível obter um bom controle da temperatura pelo fato de não haver pontos de empacotamento de leito. A eficiência do processo de leito fluidificado é garantida pelo máximo contato entre o líquido e o material suporte, pela minimização da formação de canais preferenciais e pela retenção de gás (NAZARETH, 2015).

3.5 Melaço de cana-de-açúcar

A produção de bioetanol pode ocorrer por diversos processos industriais – a partir da cana-de-açúcar, do milho, da beterraba, e até mesmo da celulose. No Brasil, a principal matéria-prima utilizada é a cana-de-açúcar, a partir da qual é obtido o caldo que passa pela fermentação, retificação e desidratação. Nas usinas também ocorre a produção de etanol a partir do melaço de caldo misto (PACHECO, 2010), como pode ser visto na Figura 1, a seguir, que mostra um fluxograma do processo produtivo do açúcar e do etanol, com a geração de melaço e outros subprodutos (ALBANEZ, 2015):

Figura 1 – Fluxograma simplificado do processo produtivo de etanol e açúcar.



Fonte: Albanez (2015).

A transformação da matéria-prima em etanol é realizada por micro-organismos – geralmente leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* – por meio da fermentação alcoólica (PACHECO, 2010). As leveduras empregadas na indústria de produção do etanol e aguardentes devem apresentar certas características, como por exemplo, boa velocidade de fermentação, tolerância ao álcool, alto rendimento, resistência e estabilidade. O processo fermentativo é feito em tanques conhecido como dornas, nelas ocorre o processo em que o açúcar da cana se transforma em etanol pelos fermentos biológicos (ANDRADE, 2008). O vinho resultante da etapa da fermentação do mosto possui uma composição complexa – além de álcool e água apresenta diversas impurezas. Este vinho é alimentado nas colunas de destilação, de forma a separar o etanol dos demais componentes.

São feitas várias destilações que se baseiam na diferença do ponto de ebulição das substâncias voláteis e tem como objetivo concentrar a mistura. O produto principal da destilação é chamado de flegma – mistura com 40 a 50% de teor alcoólico, composto de álcool e água,

que gera como resíduo a vinhaça, separada pelo processo de destilação. A flegma é então, submetido à retificação para separação dos álcoois superiores e concentração do destilado até o grau alcoólico do etanol hidratado (95,1 a 96%) ou anidro (99,6%) (AGEITEC/EMBRAPA, 2013).

O melão é um líquido escuro, viscoso e adocicado que é gerado em grande quantidade durante a fabricação de açúcar, na etapa de centrifugação, sendo geralmente destinado à produção de etanol. De acordo com Piacente (2005), cada tonelada processada de cana-de-açúcar gera de 40 a 60 kg de melão. Sua composição depende de fatores como tipo e grau de maturação da cana utilizada e do clima. A Tabela 2, apresentada a seguir, exibe um resumo da caracterização do melão realizado por diversos trabalhos na literatura.

Como pode ser visto, o melão é rico em carboidratos totais – 964.800 e 614.000 mg.L⁻¹ (PARK et al., 2010; ALBANEZ et al., 2016), com grande quantidade de matéria orgânica – DQO total por volta de 1.100.000 mg.L⁻¹ (PARK et al., 2010; LEE et al., 2014; ALBANEZ et al., 2016) e rico em nitrogênio – 16.000 e 12.900 mg.L⁻¹ (REGO, 2016; TUNÇAY et al., 2017).

Diversos trabalhos têm estudado a produção biológica de hidrogênio utilizando melão de cana-de-açúcar e melão proveniente de açúcar feito com beterraba como matéria-prima como substrato, como pode ser visto na Tabela 3.

O trabalho de Li *et al.* (2013) verificou o efeito da taxa de carregamento orgânico do lodo na produção de hidrogênio em um reator do tipo CSTR com melão como substrato a uma concentração de 2.000 mgDQO.L⁻¹, coletado de uma refinaria de açúcar de beterraba. O reator foi operado com um TDH de 8 h, pH afluente de 6,5 e TCO de 6 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e o inóculo foi proveniente de uma estação de tratamento de esgotos (ETE). Após atingir o estado de estabilização, o etanol e ácido acético foram os metabólitos mais produzidos, totalizando 71,50 % dos produtos solúveis totais. O pH do efluente se manteve em torno de 4,57 e o rendimento máximo de hidrogênio foi de 4,77 L_{H2}.d⁻¹, com um biogás com conteúdo de H₂ de 55,91%.

Wang *et al.* (2013) estudaram a produção de gás hidrogênio em um reator CSTR utilizando melão de cana de açúcar como substrato a uma concentração de 8 gDQO.L⁻¹, com pH afluente entre 4,30 e 4,40. O TDH foi variado de 10 a 4 h e TCO de 19,20 a 48 kg.m⁻³.d⁻¹ e o inóculo foi proveniente de uma ETE. A máxima produção volumétrica de hidrogênio foi de

12,27 mmol.L⁻¹.h⁻¹, obtida com o TDH de 5h. Já a eficiência de remoção de DQO variou entre 31,60 e 39,20 %.

Wu *et al.* (2013) estudaram a codigestão de melaço proveniente de açúcar de beterraba com adubo suíno líquido para otimizar a produção de H₂ em um reator anaeróbio em bateladas sequenciais, com o substrato a uma concentração de 10g_{sacarose}.L⁻¹. O TDH foi variado de 24 a 6 h, e obteve os melhores resultados com o TDH de 15,78 h sendo aplicado. Os valores máximos atingidos de rendimento e produção volumétrica de hidrogênio foram de 1,57 mol_{H2}.mol_{glicerosol}⁻¹ e 2,23 L_{H2}.d⁻¹.L⁻¹.

O estudo realizado por Zhu *et al.* (2013) averiguou a produção de hidrogênio em um reator tipo CSTR com melaço de beterraba como substrato a uma concentração de 4.000 mgDQO.L⁻¹. O reator foi operado com um TDH de 8 h, com pH afluente variando entre 4,10 e 4,50 e TCO de 12 a 18 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e o inóculo foi proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais de uma cervejaria. A eficiência máxima de remoção de DQO foi de 45% e o rendimento máximo de hidrogênio foi de 10,8 L_{H2}.d⁻¹. Os metabólitos mais produzidos foram o etanol e o ácido acético, chegando a representar 73% do total de produtos solúveis.

O trabalho Lee *et al.* (2014) avaliou a codigestão de melaço de cana de açúcar com lodo de esgoto em um reator do tipo CSTR, em que as proporções dos substratos no afluente foram variadas. Com um TDH de 0,9 dias e uma TCO de 13,70 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, o rendimento máximo de hidrogênio que se atingiu foi 31 ml_{H2}.gDQO⁻¹ e a produção volumétrica máxima 0,11 L_{H2}.L⁻¹.d⁻¹.

Albanez *et al.* (2015) estudaram a produção de hidrogênio através da codigestão de melaço proveniente de cana de açúcar e vinhaça em um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com imobilização de biomassa (AnsBBR). Para isso, foi variada a concentração dos substratos – a relação vinhaça / melaço – de forma que as concentrações finais do afluente estudadas foram de 3.000, 4.000, 6.000 e 9.000 mgDQO.L⁻¹ e o TDH variou entre 3 e 4 h. Os melhores resultados foram obtidos com a concentração de afluente de 6.000 mgDQO.L⁻¹ (67 % vinhaça e 33% melaço), TCO de 13,70 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ e TDH de 3 h, nas condições de ausência de suplementação nutricional e inóculo pré-tratado termicamente. O rendimento máximo de hidrogênio foi de 6,20 mol_{H2}.kgDQO⁻¹ e a máxima produção volumétrica de hidrogênio foi de 0,014 L_{H2}.L_{reator}⁻¹.h⁻¹.

Rego (2016) investigou a produção de gás hidrogênio em um reator do tipo RALF utilizando melão de cana de açúcar. O inóculo utilizado foi proveniente de um abatedouro de aves. O reator foi operado com TDH variando de 8 a 1 h com concentração do substrato afluente de 5 gDQO.L⁻¹. Os melhores resultados foram obtidos com uma TCO aplicada de 26 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, com conversão de carboidratos máxima de 96% e remoção de DQO máxima de 29 %. O rendimento máximo de hidrogênio alcançado foi de 1,40 mol_{H₂}.mol_{sacarose}⁻¹ e com uma produção volumétrica de hidrogênio correspondente de 0,20 L_{H₂}.L_{reator}⁻¹.h⁻¹. Os metabólitos solúveis mais produzidos foram os ácidos acético, butírico, isobutírico, propiônico e succínico.

Kayahan *et al.* (2017) estudou a produção de hidrogênio com substrato como melão de cana de açúcar a uma concentração de 5mM em um fotobioreator operado em ciclos de dia e noite. Seus melhores resultados obtidos foram de rendimento de hidrogênio de 0,88 mol_{H₂}.mol_{sacarose}⁻¹ e produção volumétrica de 0,31 mol_{H₂}.m⁻³.h⁻¹. Já os ensaios em batelada por 17 dias de Tunçay *et al.* (2017), com o mesmo substrato, a uma concentração de 10 gDQO.L⁻¹, atingiram rendimento de 2,88 mmol_{H₂}.gDQO⁻¹ e produção volumétrica de 8,26 ml_{H₂}.L⁻¹.h⁻¹.

O trabalho de Chaves (2018) foi avaliar a produção de hidrogênio durante a operação de um reator RALF com melão de cana de açúcar a uma concentração de 25 gDQO.L⁻¹. O TDH foi variado de 12 a 3 h e, com o TDH de 6 h e TCO de 100 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ aplicados, o rendimento máximo de 3,07 mol_{H₂}.mol_{glicose}⁻¹ e produção volumétrica de 1,07 L_{H₂}.L_{reator}⁻¹.h⁻¹ foram atingidos.

Tabela 2 - Caracterização do melão de cana-de-açúcar pela literatura.

Parâmetro (mg.L ⁻¹)	Referência					
	(TUNÇAY et al., 2017)	(REGO, 2016)	(ALBANEZ, 2015)	(LEE et al., 2014)	(PARK et al., 2010)	
Água (v/v)	-	-	-	-	27,70%	
Açúcares	Glicose	ND	-	-	11.414	169.000*
	Sacarose	760.380 ± 1.060	-	-	-	87.000*
	Frutose	6.623 ± 610	-	-	-	264.000*
Alcalinidade a CaCO ₃	Total	27.000 ± 2.000	-	-	-	5.900
Cálcio	-	6.200	-	-	-	-
Carboidratos totais	-	1.079,7 ± 114,4	964.800	-	-	614.000*
Cobre	0,01	2,04	-	-	-	-
Carbono orgânico total	-	13.028	-	-	-	-
DQO _{solúvel}	1.153.000 ± 23.000	-	-	119.200	-	1.032.400
DQO _{total}	1.331.000 ± 130.000	1.157,6 ± 152,3	1.104.000	128.400	-	1.082.200
Ferro	6,88	-	-	-	-	-
Fósforo	-	1.100	-	-	-	590,00
Magnésio	-	3.120	-	-	-	-
Níquel	0,11	-	-	-	-	-
Nitrogênio	NTK	16.000 ± 0	12.900	-	-	-
	Amoniacal	700 ± 40	-	-	-	-
	Total	-	-	-	30,00	37.800
pH ^a	-	-	-	3,45	-	4,30
Potássio	7.300	27.400	-	-	-	-
Sólidos	SST	140.000 ± 25.000	-	-	4.267	11.600
	SSV	121.000 ± 24.000	-	-	4.267	7.200
	SSF	-	-	-	-	4.400
	ST	-	-	-	89.700	578.000
	SV	-	-	-	86.200	501.200
	SF	-	-	-	-	76.800
Sulfatos	-	-	-	-	-	26.400
Zinco	0,00	12,60	-	-	-	-

^apH - Sem unidade; ND - Não Detectado; *Unidade: mg.kg⁻¹. Fonte: Autora (2019).

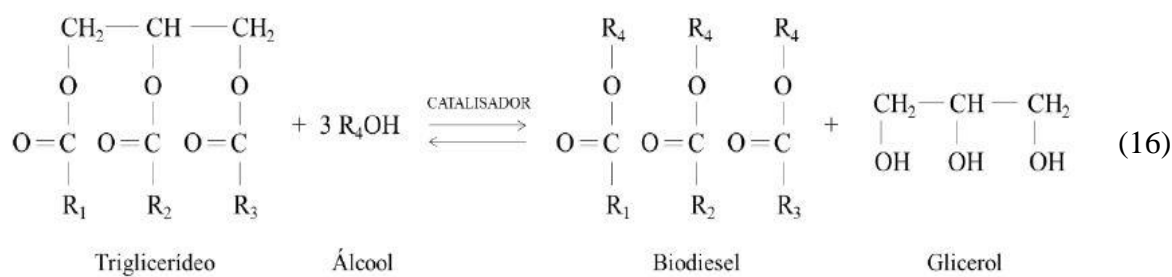
Tabela 3 - Produção de hidrogênio com melação como substrato.

Referência	Substrato Co- Substrato	Reator	pH Concentração substrato	TDH / Tempo TCO	HY _{máx} HPR _{máx}
(LI; AI; REN, 2013)	MB -	CSTR	6,5 2000 mgDQO.L ⁻¹	8 h 6 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	4,77 ± 0,15 L _{H2} .d ⁻¹ NC
(WANG; LI; REN, 2013)	MC -	CSTR	4,30 a 4,40 8 gDQO.L ⁻¹	10, 8, 6, 5 e 4 h 19,2 a 48 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	NC 0,31 L _{H2} .L _{reator} ⁻¹ .h ⁻¹
(WU; LIN; ZHU, 2013)	MB Adubo suíno	ASBR	5,55 10g _{sacarose} .L ⁻¹	24 a 6 h (15,78 h) NC	1,57 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{sacarose} 2,23 L _{H2} .d ⁻¹ .L ⁻¹
(ZHU et al., 2013)	MB -	CSTR	4,10 a 4,50 4000 mgDQO.L ⁻¹	8 h 12 e 18 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	10,8 L _{H2} .d ⁻¹ NC
(LEE et al., 2014)	MC Lodo de esgoto	CSTR	4,05 ± 0,10 MC:esgoto (v:v) 10:0; 7:3; 5:5 e 0:10	0,90 d 13,70 gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	31,00 ± 7,60 ml _{H2} .gDQO ⁻¹ 0,11 L _{H2} .L ⁻¹ .d ⁻¹
(ALBANEZ et al., 2016)	Vinhaça MC	AnsBBR	5,00 ± 0,20 3000, 4000, 6000 e 9000 mgDQO.L ⁻¹ Vinhaça/MC: 67/33%	3 e 4 h 13,70 gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	6,20 mol _{H2} .kgDQO ⁻¹ 0,014 L _{H2} .L _{reator} ⁻¹ .h ⁻¹
(REGO, 2016)	MC -	RALF	3,96 ± 0,14 5 gDQO.L ⁻¹	8, 6, 4, 2 e 1h 26 ± 7 gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	1,40 ± 0,60 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{sacarose} 0,2 L _{H2} .L _{reator} ⁻¹ .h ⁻¹
(YUN; CHO, 2016)	MC -	CSTR	3,80 a 4,90 19 a 35 gDQO.L ⁻¹	1 d 19 a 35 gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ 31 gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	NC 0,51 ± 0,06 L _{H2} .d ⁻¹
(KAYAHAN; EROGLU; KOKU, 2017)	MC -	Fotobioreator (4 <i>stacked U- tubes and 2 vertical manifolds</i>)	5,90 5 mM	Ciclo dia/noite NC	0,88 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{sacarose} 0,31 mol _{H2} .m ⁻³ .h ⁻¹
(TUNÇAY et al., 2017)	MB -	Batelada	3,47 a 3,65 10 gDQO.L ⁻¹	17 d NC	2,88 mmol _{H2} .g ⁻¹ DQO 8,26 ml _{H2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
CHAVES (2018)	MC -	RALF	3,99 ± 0,11 25 gDQO.L ⁻¹	12, 6, 4 e 3 h 100 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	3,07 ± 0,05 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicose} 1,07 ± 0,03 L _{H2} .L _{reator} ⁻¹ .h ⁻¹

MC - Melação de cana-de-açúcar; MB - Melação de beterraba; NC - não consta; HY_{máx} - Rendimento de hidrogênio máximo; HPR_{máx} - Produção volumétrica de hidrogênio máxima; pH - pH efluente ou final do experimento, em que se registrou a melhor produção de hidrogênio. Fonte: Autora (2019).

3.6 Glicerol bruto

A principal rota de obtenção do biodiesel é por meio do processo de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais usando catálise básica na presença de um álcool. Quimicamente, o óleo ou a gordura usada na produção do biodiesel é um triglicérideo, que sob a ação de um catalisador básico, – geralmente hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) – na presença de álcool (metanol – biodiesel metílico ou etanol – biodiesel etílico) sofre transesterificação. Nesse processo, se formam três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos – que constituem o biodiesel em sua essência – e é liberada uma molécula de glicerol, como pode ser visto a Equação 16, a seguir (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009):

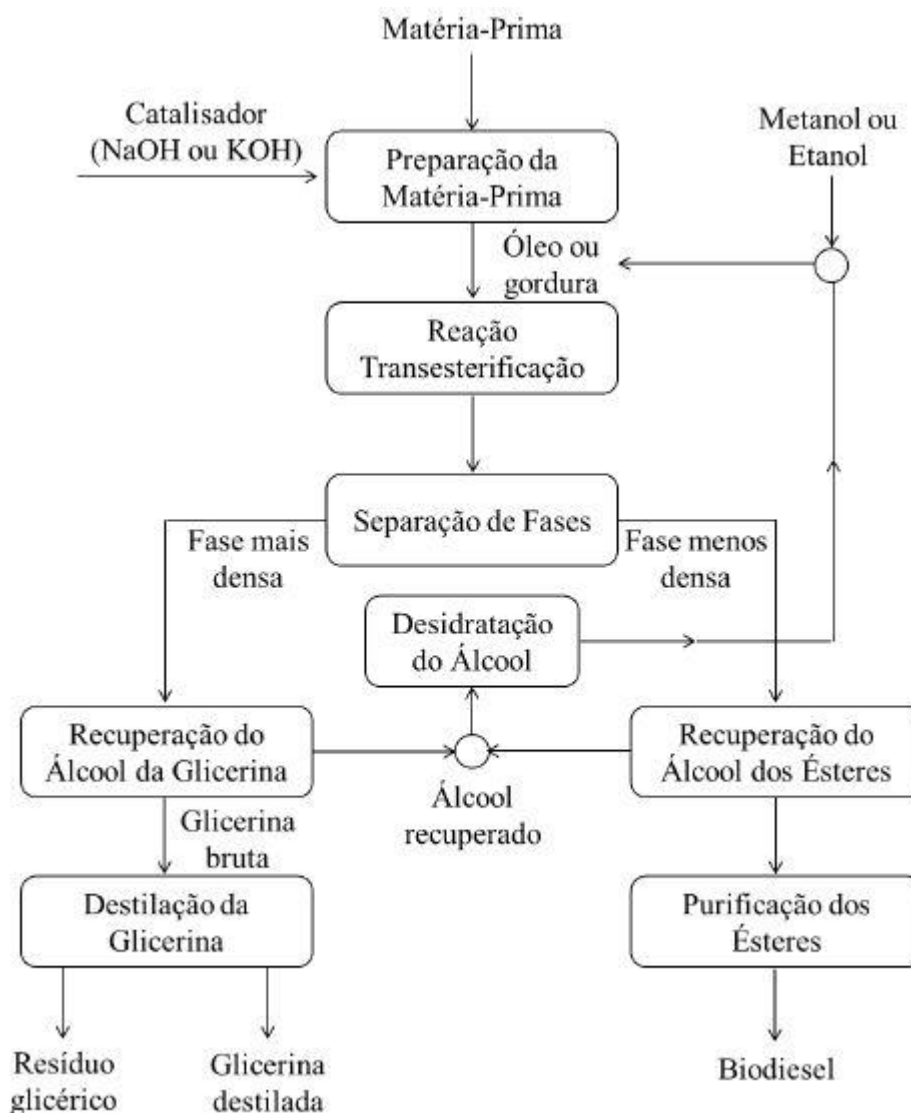


A Figura 2, a seguir, apresenta o fluxograma do processo produtivo do biodiesel, o qual se inicia pela escolha da sua matéria-prima. Depois de sua escolha, a etapa de preparação para a transesterificação consiste nos processos de clareamento (remoção de pigmentos) e degomagem (retirada de resquícios de umidade). O processo ocorre em meio alcalino e em temperaturas próximas a 60°C. Após a reação de transesterificação se obtém uma massa constituída por duas fases – uma mais densa e outra menos densa, separáveis por decantação em tanques horizontais ou por centrifugação (KNOTHE et al., 2006).

A fase mais densa é constituída por glicerol bruto, excesso de álcool, de água e impurezas inerentes à matéria-prima, as quais determinam o grau de pureza do glicerol (KNOTHE et al., 2006). Submetida ao processo de evaporação por aquecimento a 70°C para recuperação do álcool (ou metanol), o glicerol apresenta-se parcialmente livre de impurezas (RIVALDI, 2007). A destilação do glicerol é realizada para obtenção de níveis de pureza mais elevados (aproximadamente 99%), sendo que tal processo ocorre sob condição de alto vácuo (600 a 1.330 Pa absoluto), em temperaturas superiores a 190°C e inferiores a 200°C – pois em temperaturas superiores o glicerol pode se polimerizar e até se decompor (MARÇON, 2010).

Já a fase menos densa é composta por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, – a depender da natureza do álcool utilizado – de excesso de álcool reacional e impurezas. A purificação dos ésteres ocorre pelo processo de centrifugação e desumidificação, obtendo-se o biodiesel (KNOTHE et al., 2006).

Figura 2 – Fluxograma do processo produtivo do biodiesel.

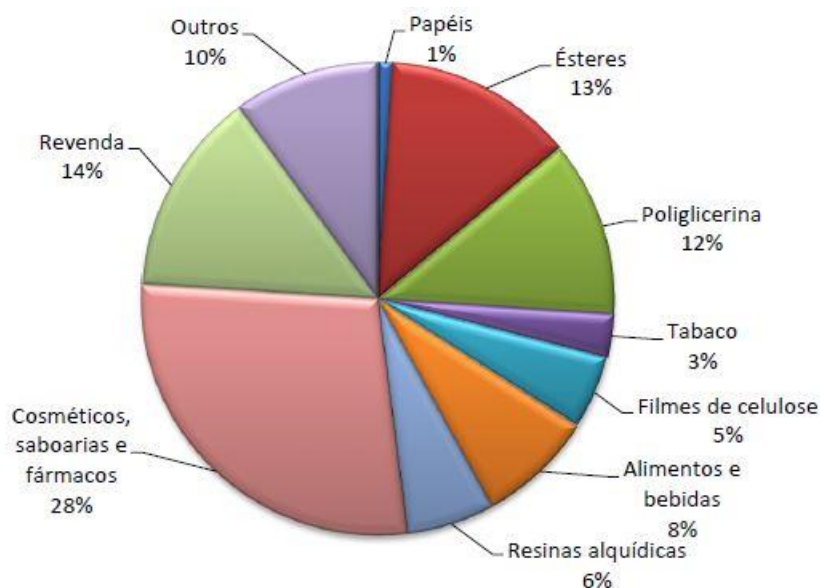


Fonte: Knothe et al. (2006).

O termo glicerol é utilizado para denominar o componente químico puro 1,2,3-propanotriol, resíduo da produção de biodiesel. Já o termo glicerina se aplica aos produtos comerciais purificados, que normalmente contém pelo menos 95% de glicerol (KNOTHE et al., 2006). Na reação de transesterificação o volume de glicerol corresponde a 10% do volume total de produtos (TEMUDO et al., 2008).

A glicerina – ou glicerol puro – oriunda do glicerol bruto é utilizada em diferentes processos, como a fabricação de cosméticos, remédios, alimentos e tabaco (KNOTHE et al., 2006). A Figura 3, a seguir, apresenta os principais setores industriais nos quais a glicerina é aplicada:

Figura 3 – Principais setores industriais de aplicação da glicerina.



Fonte: Mota et al., 2009.

Mesmo com diversas opções de aplicação para o glicerol purificado, o este precisa de outra destinação devido ao grande volume produzido. Somente no ano de 2011, a produção de glicerol foi de 260 mil toneladas, volume quase sete vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas. Uma alternativa de aplicação desse resíduo é produção de energia, por meio do aproveitamento do hidrogênio via digestão (FAPESP, 2012).

A Tabela 4, a seguir, exhibe um resumo da caracterização do glicerol bruto realizado por diversos trabalhos na literatura. Nota-se que é constituído, em sua maioria, por glicerol e, entre os trabalhos vistos, a maior parte deles estudou glicerol proveniente de biodiesel metílico, visto que o metanol foi uma impureza caracterizada por todos.

Além do metanol, vale destacar a presença de resíduos de sabão e cinzas como impurezas. Ainda, foram encontrados resíduos de matéria orgânica diferentes de glicerol – 1,4 e 6,2% (MARQUES et al., 2009; VIANA, 2011) e outros resíduos não identificados (TANG et al., 2009; LIU; KOH; JI, 2011). A água e a umidade foram identificadas no glicerol bruto por

alguns autores (LIU; KOH; JI, 2011; VIANA, 2011; VARRONE et al., 2012; LOVATO et al., 2017).

Há muitos trabalhos na literatura com estudos sobre a produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol – em sua forma pura (comercial) e bruta (industrial), como pode ser visto nas Tabelas 5 e 6. A maior parte dos trabalhos é com reatores operando em batelada e observa-se que há carência de pesquisas utilizando glicerol junto a cosubstratos.

Bernal *et al.* (2013) estudaram a produção biológica de hidrogênio utilizando glicerol como substrato a uma concentração de 50 g.L⁻¹ usando fermentação em batelada, em duplicata durante 72 h. Como inóculo foram utilizadas 13 cepas nativas da bactéria *Clostridium spp* isoladas. Com pH de 3,95, o rendimento máximo de hidrogênio obtido foi de 0,20 mol_{H2}.mol_{glicero}⁻¹ e a máxima produção volumétrica de hidrogênio 0,32 mg_{H2}.h⁻¹.L⁻¹.

O trabalho de Lo *et al.* (2013) estudou a codigestão de glicerol bruto e glicerina pura em um reator do tipo CSTR e em batelada. Nos reatores em batelada o pH inicial foi de 7,00 e no reator CSTR não houve controle de pH, em ambos a concentração de substrato afluente foi de 10 g.L⁻¹. Como inóculo foi utilizada a cepa de *C. pasteurianum* CH4. No reator CSTR foi aplicado um TDH de 12 h. Com glicerol puro o rendimento máximo de hidrogênio foi de 0,50 mol_{H2}.mol_{glicero}⁻¹, enquanto a máxima produção volumétrica de hidrogênio foi de 103,1 ml.h⁻¹.L⁻¹. Já com glicerol bruto os resultados foram de 0,77 mol_{H2}.mol_{glicero}⁻¹ e 166 ml.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Os resultados foram melhores com o glicerol industrial, e os autores atribuíram isso ao fato de que o resíduo poderia conter impurezas como fosfato, que pode estimular a produção de hidrogênio. Os principais metabólitos foram 1,3- propanodiol, ácido butírico, butanol, acetato e ácido láctico.

Maru *et al.* (2013) avaliaram a produção de hidrogênio em batelada e em um reator contínuo tipo *chemostat setup* utilizando glicerol como substrato com uma concentração afluente variando de 2,50 a 40 g.L⁻¹ e pH entre 7 e 7,50. Nos ensaios em batelada o rendimento máximo de hidrogênio foi de 2,84 mol_{H2}.mol_{glicero}⁻¹ e a máxima produção volumétrica de hidrogênio foi de 1,60 mmol.L⁻¹.h⁻¹. Já no reator contínuo os melhores resultados obtidos foram de 2,41 mol_{H2}.mol_{glicero}⁻¹ e 2,34 mmol.L⁻¹.h⁻¹.

Reungsang *et al.* (2013) examinaram a produção de hidrogênio em um reator UASB utilizando como substrato glicerol puro e glicerol bruto a uma concentração de 25g.L⁻¹. A TCO

variou de 25 a 75 g.L⁻¹.d⁻¹ e teve os melhores resultados com a TCO aplica de 50 g.L⁻¹.d⁻¹. Para o glicerol puro o rendimento máximo de hidrogênio foi de 410 mmol_{H2}.mol_{glicerol}⁻¹ e a máxima produção volumétrica de hidrogênio foi de 9 mmol_{H2}.h⁻¹.L⁻¹. Já com o glicerol bruto os melhores resultados alcançados foram inferiores, de 324 mmol_{H2}.mol_{glicerol}⁻¹ e 6,20 mmol_{H2}.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Os principais metabólitos produzidos foram etanol, 1,3-propanodiol e ácido fórmico.

De Sá *et al.* (2013) estudaram a produção de hidrogênio em ensaios em batelada de 72h utilizando glicerol puro como substrato a uma concentração de 10 g.L⁻¹ e um pH inicial de 5,50. Os principais metabólitos obtidos foram 1,3-propanodiol, ácido acético e ácido butírico. E o rendimento máximo de hidrogênio atingido foi de 0,80 mol_{H2}.mol_{glicerol}⁻¹.

Bósio (2014) avaliou a produção de hidrogênio em um reator granular de leito expandido (EGSB) e um reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) com glicerol bruto como substrato, a uma concentração de 5 g.L⁻¹. O TDH aplicado no EGSB variou de 24 a 1 h, e no RALF variou de 14 a 1 h, em ambos foi o TDH que de 1 h que apresentou os melhores resultados. No EGSB o rendimento máximo de hidrogênio foi 0,85 mol_{H2}.mol_{glicerol}⁻¹ e a máxima produção volumétrica de hidrogênio foi 0,73 L.h⁻¹.L⁻¹. Já no RALF os resultados foram 2,87 mol_{H2}.mol_{glicerol}⁻¹ e 1,71 L.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Os principais metabólitos detectados foram 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico.

Bravo *et al.* (2014) estudaram a produção biológica de hidrogênio em um reator tipo AnsBBR utilizando três tipos de glicerol como substrato: puro, bruto, e bruto sintético, com concentrações de 3.000, 4.000 e 5.000 mgDQO.L⁻¹. O TDH aplicado variou de 3 a 4 h e a TCO de 7.565 a 16.216 mgDQO.L⁻¹.d⁻¹. Os melhores resultados foram atingidos com o glicerol puro, na concentração 5.000 mgDQO.L⁻¹, com o TDH de 4 h e TCO de 12.911 mgDQO.L⁻¹.d⁻¹, correspondendo a um rendimento de 21,10 mol_{H2}.kgDQO⁻¹ e uma produção volumétrica de 67,50 mol_{H2}.m⁻³.d⁻¹. Com as mesmas concentrações de substrato e o mesmo tipo de reator, Lovato *et al.* (2015) atingiram os melhores resultados no TDH de 3 h e TCO de 17,80 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, resultando em um rendimento de 5,70 mol_{H2}.kgDQO⁻¹ e produção volumétrica de 100,80 mol_{H2}.m⁻³.d⁻¹.

Chookaew *et al.* (2014) avaliaram a produção biológica de hidrogênio em um reator tipo UASB utilizando glicerol bruto como substrato, com concentração 10, 20 e 30 g.L⁻¹. O TDH variou de 12 a 2 h e os melhores resultados foram observados com a concentração de substrato

de 10 g.L⁻¹ e o TDH aplicado de 4 h, de forma que o rendimento máximo de hidrogênio foi 44,27 mmol_{H2}.mol_{glicérol}⁻¹ e produção volumétrica de hidrogênio correspondente foi 165,21 mmol_{H2}.L⁻¹.d⁻¹. O principal metabólito produzido foi o 1,3-propanodiol.

Ferreira (2014) operou um reator tipo RALF para avaliar a influência do TDH na produção de H₂ utilizando glicérol bruto como substrato a uma concentração de 5 gDQO.L⁻¹. Assim, o TDH variou de 14 a 1 h e seus resultados mostraram que o maior rendimento e maior produtividade volumétrica de hidrogênio foram alcançados com o TDH de 1 h, sendo 3 mol_{H2}.mol_{glicérol}⁻¹ e 1508,7 ml.h⁻¹.L⁻¹. O metabólito mais produzido foi 1,3-propanodiol.

Nazareth (2015) estudou a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e gás hidrogênio em um reator tipo RALF com glicérol bruto como substrato a uma concentração de 5g.L⁻¹. O TDH variou de 8 a 0,5 h e os melhores resultados para a produção de hidrogênio foram alcançados com o TDH de 1 h e TCO de 486,40 kg.m⁻³.d⁻¹. Os rendimentos de ácido propiônico e de 1,3-propanodiol foram atingidos com o TDH de 8 h, sendo de 1,77 e 0,82 mol.mol_{glicérol}⁻¹, respectivamente. Já a máxima produção volumétrica de H₂ foi de 13,20 ml.h⁻¹.L⁻¹.

O trabalho de Tapia-Venegas *et al.* (2015) avaliou a produção biológica de hidrogênio com concentrações crescentes de glicérol bruto como substrato em um reator tipo CSTR com glicose como cosubstrato. As concentrações variaram de 0 a 5 g.L⁻¹ e os melhores resultados foram obtidos com uma proporção de glicose / glicérol 60% para 40%. Com um tempo de detenção hidráulica de 12 h, foi possível atingir um rendimento máximo de 5,40 mol_{H2}.mol_{glicérol}⁻¹ e uma produção volumétrica de 41,70 ml_{H2}.L⁻¹.h⁻¹.

Lovatel (2016) estudou a produção de hidrogênio através da digestão de glicérol bruto e vinhaça em ensaios em batelada de 36 h. A concentração de afluente foi de 10 g.L⁻¹ e a proporção de substratos que obteve os melhores resultados foi de 20 % de vinhaça para 80% de glicérol bruto e pH inicial de 5. O volume total de hidrogênio produzido foi de 10.070 ml_{H2} com atividade hidrogênica específica de 0,85 mmol_{H2}.gSSV⁻¹.h⁻¹.

O estudo de Paranhos (2016) teve como objetivo otimizar a produção de gás hidrogênio e de metabólitos solúveis em um reator RALF com glicérol como substrato (usou bruto e puro) a concentrações variadas – os melhores resultados para a produção de H₂ foram obtidos a 10 g.L⁻¹. O TDH variou de 9,24 a 0,76 h e, com o TDH de 0,76 h e TCO de 260,41 kg.m⁻³.d⁻¹, os

maiores rendimentos e produções volumétricas de H₂ foram de 0,07 mol_{H₂}.mol_{glicérol}⁻¹ e 9,74 mmol_{H₂}.L⁻¹.h⁻¹. Dentre os principais metabólitos solúveis produzidos, 1,3-PDO e ácido propiônico (HPr) se destacaram

Lopes *et al.* (2017) estudaram a cofermentação de glicérol bruto e soro de queijo em um reator do tipo EGSB (reator anaeróbio de leito granular expandido). Para isso, a concentração do soro de queijo foi fixada em 5g.L⁻¹ e a concentração de glicérol bruto foi aumentada progressivamente, enquanto diminuía o TDH. A concentração que obteve o melhor rendimento de hidrogênio foi a de 5/1 de soro de queijo/glicérol bruto, atingindo 0,120 mmol_{H₂}.g⁻¹DQO com um TDH aplicado de 8 h e TCO de 42 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. O máximo valor de produção volumétrica de hidrogênio foi de 0,0425 L.h⁻¹.L⁻¹, alcançado ao reduzir o TDH de 8h para 0,5 h.

Lovato *et al.* (2017) estudaram a codigestão de glicérol bruto e soro de queijo em um reator AnsBBR com substrato a uma concentração de 7.000 mgDQO.L⁻¹. O TDH variou de 2 a 4h, e com o TDH de 3 h e TCO aplicada de 24 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ foi atingido um rendimento máximo de 5,40 mol_{H₂}.kgDQO⁻¹ e produção volumétrica de 129 mol_{H₂}.m⁻³.d⁻¹.

Já os ensaios em batelada de Santos (2017) utilizaram glicérol bruto e glicérol puro como substrato para comparar qual produzia mais hidrogênio. As concentrações foram variadas, entre 2,5 e 20 gDQO.L⁻¹ em ensaios de 20 dias. O melhor resultado foi obtido utilizando glicérol puro a uma concentração de 20 gDQO.L⁻¹, sendo um rendimento de 0,55 mol_{H₂}.mol_{glicérol}⁻¹ e uma produção volumétrica de 172,50 ml_{H₂}.h⁻¹.g⁻¹SSV.

Sittijunda e Reungsang (2017) avaliaram a produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol e etanol com glicérol como substrato em um reator UASB. O pH inicial foi de 5,50 e a concentração do afluente 25 g.L⁻¹. As TCOs aplicadas foram variadas de 25 a 62,50 g.L⁻¹.d⁻¹, com os melhores resultados obtidos com a TCO de 50 g.L⁻¹.d⁻¹, sendo um rendimento de 579,80 mmol_{H₂}.mol_{glicérol}⁻¹ e uma produção volumétrica de 134,20 mmol_{H₂}.L⁻¹.

Simões (2017) aplicou o substrato glicérol bruto em um reator tipo RALF a uma concentração de 10 g.L⁻¹. O TDH variou de 8 a 0,50 h e a TCO aplicada foi de 480 kg_{glicérol}.m⁻³.d⁻¹, tendo os melhores resultados sido obtidos com TDH de 0,50 h, e correspondendo a um rendimento de 0,28 mol_{H₂}.mol_{glicérol}⁻¹ e uma produção volumétrica de 73,67 mmol.h⁻¹.L⁻¹.

Tabela 4 – Caracterização do glicerol bruto pela literatura.

Parâmetro (mg.L ⁻¹)	Referência							
	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017)	(LOVATO et al., 2017)	(MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012)	(VARRONE et al., 2012)	(LIU; KOH; JI, 2011)	(VIANA, 2011)	(MARQUES et al., 2009)	(TANG et al., 2009)
Água	-	2 - 3*	-	-	142.330 ± 6.020	-	-	-
Cinzas	-	-	-	2,00*	32.980 ± 160	6,20*	4,60*	-
Cloretos	10.000 ^c	-	-	7,00*	-	46.100*	-	-
Densidade Absoluta	-	-	-	-	-	1,26 ^d *	-	-
Ésteres metílicos		15 - 18*						
Fósforo	50,00	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	230.000	8 - 12*	30,00*	1,00*	ND	0,05*	0,03*	1,50 ± 0,20*
Nitrogênio Total	500,00	-	-	-	-	-	-	-
Outros resíduos	-	-	-	-	12.650 ± 2.090	-	-	5,20 ± 1,00*
pH ^a	-	-	12,00*	-	-	5,50	-	-
Resíduos de Sabão	17.700	12 - 16*	-	-	15.700 ± 2.500	-	-	-
Sulfato de Sódio	-	-	-	-	-	-	-	25,80 ± 2,70*
Teor de Glicerol	441.300	50 - 60*	45,00*	90,00*	1.024.320 ± 2.460	82,40*	86,00*	67,50 ± 3,20*
Teor de MONG ^b	-	-	-	-	-	1,40*	6,20*	-
Umidade	-	-	-	< 0,40*	-	10,00*	-	-

^apH - Sem Unidade; ^bMatéria Orgânica Não Glicerol; ^cCloreto de Sódio (NaCl); ^dUnidade: kg.L⁻¹; ND - Não Detectado (Valor aferido após pré-tratamento em autoclave com o objetivo de remover resíduos de metanol do glicerol bruto); *Unidade: em porcentagem. Fonte: Autora (2019).

Tabela 5 - Produção de hidrogênio com glicerol como substrato.

Referência	Substrato Co- substrato	Reator	pH Concentração substrato	TDH / Tempo TCO	HY _{máx} HPR _{máx}
(BERNAL et al., 2013)	NC -	Batelada	3,95 50 g.L ⁻¹	72 h NC	0,20 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 0,32 mg _{H₂} .h ⁻¹ .L ⁻¹
(LO et al., 2013)	GP GB -	Batelada CSTR	7 (inicial) 10 g.L ⁻¹ Não controlado 10 g.L ⁻¹	NC 12 h NC	0,50 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 103,1 ml.h ⁻¹ .L ⁻¹ 0,77 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicerol} 166 ml.h⁻¹.L⁻¹
(MARU et al., 2013)	NC -	Batelada <i>Chemostat setup</i> (contínuo)	7 a 7,50 2,50 a 40 g.L ⁻¹	NC NC	2,84 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 1,60 mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹ 2,41 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 2,34 mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹
(REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013)	GP GB -	UASB	4,30 ± 0,10 25 g.L ⁻¹	14 h (batelada inicial) 25; 37,5; 50 ; 62,50 e 75 g.L ⁻¹ .d ⁻¹	410 mmol_{H₂}.mol⁻¹_{glicerol} 9 mmol_{H₂}.h⁻¹.L⁻¹ 324 mmol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 6,20 mmol _{H₂} .h ⁻¹ .L ⁻¹
(DE SÁ et al., 2013)	GB -	Batelada	5,50 ± 0,10 (inicial) 10 g.L ⁻¹	72 h NC	0,80 ± 0,14 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} NC
(BOSIO, 2014)	GB -	RALF EGSB	4 a 5 5 g.L ⁻¹	14; 12; 10; 8; 6; 4; 2 e 1 h 24 a 1 h	0,85 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 0,73 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ 2,87 mol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 1,71 L.h ⁻¹ .L ⁻¹
(BRAVO et al., 2014)	GP GB GBS -	AnsBBR	4 a 5 3.000, 4.000, 5.000 mgDQO.L ⁻¹	3 e 4 h 12.911 mgDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	21,10 mol _{H₂} .kgDQO ⁻¹ 67,50 mol _{H₂} .m ⁻³ .d ⁻¹
(CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2014)	GB -	UASB	6,30 a 6,60 10 , 20, 30 g.L ⁻¹	24 h (batelada); 12, 10, 8, 6, 4 , 2 h (contínuo) NC	44,27 mmol _{H₂} .mol ⁻¹ _{glicerol} 165,21 mmol _{H₂} .L ⁻¹ .d ⁻¹

GP - Glicerol puro (comercial); GB - Glicerol bruto (industrial); GBS - Glicerol bruto sintetizado; NC - não consta; HY_{máx} - Rendimento de hidrogênio máximo; HPR_{máx} - Produção volumétrica de hidrogênio máxima; pH - pH efluente ou final do experimento, em que se registrou a melhor produção de hidrogênio. Fonte: Autora (2019).

Tabela 6 – Continuação - Produção de hidrogênio com glicerol como substrato.

Referência	Substrato Co- substrato	Reator	pH Concentração substrato	TDH / Tempo TCO	HY _{máx} HPR _{máx}
(FERREIRA, 2014)	GB -	RALF	4,80 ± 0,20 5 gDQO.L ⁻¹	14; 12; 10; 8; 6; 4; 2; e 1 h NC	3 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicerol} 1508,70 ml.h ⁻¹ .L ⁻¹
(LOVATO et al., 2015)	GP GB -	AnsBBR	4,2 3.000, 4.000 e 5.000 mgDQO.L ⁻¹	3 e 4 h 17,80 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	5,70 mol _{H2} .kgDQO ⁻¹ 100,80 mol _{H2} .m ⁻³ .d ⁻¹
(NAZARETH, 2015)	GB -	RALF	4,32 ± 0,10 5 g.L ⁻¹	8, 6, 4, 2, 1 , 0,5 h 486,40±58,70 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	NC 13,20 ml.h ⁻¹ .L ⁻¹
(TAPIA- VENEGAS et al., 2015)	GB Glicose	CSTR	5,50 0 a 5 g.L ⁻¹ Glicose/GB: 60/40%	12 h NC	5,40 ± 1,20 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicerol} 41,70 ± 6,20 ml _{H2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
(LOVATEL, 2016)	GB Vinhaça	Batelada	5 10 g.L ⁻¹ Vinhaça/GB: 20/80%	36 h NC	10.070 ml _{H2} 0,85 mmol _{H2} .gSSV ⁻¹ .h ⁻¹
(PARANHOS, 2016)	GP GB -	RALF	3,99 a 4,76 17,1 g.L ⁻¹ a 2,9 g.L ⁻¹ 10 g.L⁻¹	9,24 a 0,76 h 260,41 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	0,07 ± 0,03 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicerol} 9,74 ± 2,78 mmol _{H2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
(LOPES; RAMOS; SILVA, 2017)	GB Soro de queijo	EGSB	3,70 a 4,30 SQ/GB: 5/1 , 5/2, 5/3, 5/4, 5/5g.L ⁻¹	8 , 4, 2 a 0,50 h 42 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	0,12 mmol.g ⁻¹ DQO 0,0425 L.h ⁻¹ .L ⁻¹
(LOVATO et al., 2017)	GB Soro de queijo	AnsBBR	4,50 7000 mgDQO.L ⁻¹	2, 3 , 4 h 24 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	5,40 mol _{H2} .kgDQO ⁻¹ 129 mol _{H2} .m ⁻³ .d ⁻¹
(SANTOS, 2017)	GP GB -	Batelada	6,90 a 7,99 2,50; 5; 10; 15; 20 gDQO.L⁻¹	20 d NC	0,55 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicerol} 172,50 ml _{H2} .h ⁻¹ .g ⁻¹ _{SSV}
(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017)	GP GB -	UASB	5,50 25 g.L ⁻¹	14 h (batelada inicial) 25; 37,5; 50 e 62,5 g.L ⁻¹ .d ⁻¹	579,80 mmol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicerol} 134,20 mmol _{H2} .L ⁻¹
(SIMÕES, 2017)	GB -	RALF	4,66 ± 0,18 10 g.L ⁻¹	8, 6, 4, 2, 1 e 0,50 h 480 kg _{glicerol} .m ⁻³ .d ⁻¹	0,28 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicerol} 73,67 mmol.h ⁻¹ .L ⁻¹

GP - Glicerol puro (comercial); GB - Glicerol bruto (industrial); GBS - Glicerol bruto sintetizado; NC - não consta; HY_{máx} - Rendimento de hidrogênio máximo; HPR_{máx} - Produção volumétrica de hidrogênio máxima; pH - pH efluente ou final do experimento, em que se registrou a melhor produção de hidrogênio. Fonte: Autora (2019).

3.6.1 Impurezas e pré-tratamento do glicerol bruto

O glicerol bruto gerado durante a produção de biodiesel costuma conter impurezas como metanol, sabão, óleos e materiais orgânicos sólidos (CHI et al., 2007; SELEMBO et al., 2009; NGO; KIM; SIM, 2011). Chi et al. (2007) detectou a presença de 16% de impurezas em uma amostra de glicerol bruto coletada em uma refinaria de biodiesel, dentre as quais foram encontradas sabão, ácidos graxos livres, metanol, triglicerídeos que não reagiram, diglicerídeos e monoglicerídeos.

Ito et al. (2005) encontrou 540 g.L^{-1} de carbono orgânico total com cinzas (8% p/p), metanol (25% p/p), diacilglicerol (0,04% p/p) e monoacilglicerol (0,01% p/p) (ITO et al., 2005). Já Tang et al. (2009) citou impurezas como sulfato de sódio ($25,8 \pm 2,7\%$ p/p), metanol ($1,5 \pm 0,2\%$ p/p), água e outros componentes ($5,2 \pm 1,0\%$ p/p) (TANG et al., 2009). E Athalye et al (2009) analisou uma amostra de glicerol bruto com concentração de glicerol puro de 30 g.L^{-1} e conteúdo de sabão de aproximadamente 20% e 12% de metanol (ATHALYE; GARCIA; WEN, 2009).

O trabalho de Liang et al (2010) caracterizou uma amostra de glicerol bruto com concentração de glicerol puro ($48,7 \pm 0,2\%$ p/p), sabão ($3,0 \pm 0,2\%$ p/p), metanol ($22,7 \pm 0,4\%$ p/p) e água ($25,6 \pm 0,4\%$ p/p) (LIANG et al., 2010). Uma amostra de glicerol bruto proveniente da fabricação de biodiesel pode ainda conter pequenas quantidades do óleo usado para o processo de transesterificação e outras impurezas presentes no óleo (CHI et al., 2007; SARMA et al., 2012).

Com quantidades de metanol que chegam até 25% (ITO et al., 2005), estudos tem comprovado que o metanol é um fator inibidor de crescimento microbiano quando o glicerol bruto é utilizado como substrato (CHI et al., 2007; ATHALYE; GARCIA; WEN, 2009). Além de ser um contaminante com potencial tóxico para o meio ambiente se descartado sem tratamento adequado, o excesso de metanol pode contaminar a água subterrânea (SARMA et al., 2012).

De forma similar, com a adição de hidróxido de sódio para a produção de biodiesel durante o processo de transesterificação, o pH do resíduo gerado costuma ser mais alto e deve ser neutralizado antes de ser descartado. Águas residuárias com pH elevado, ao serem jogadas

no meio ambiente sem tratamento prévio podem ser prejudiciais para a comunidade biótica do ecossistema (SARMA et al., 2012).

Assim, devido à presença de tais impurezas, diversos autores na literatura desenvolveram técnicas de pré-tratamento do glicerol bruto. Chi et al (2007) utilizou o seguinte protocolo: misturar o glicerol bruto com água destilada em uma razão de 1:4 (v/v) para reduzir a viscosidade do fluido; ajustar o pH do fluido para 6,5 com ácido clorídrico, com o objetivo de converter os resíduos solúveis de sabão em ácidos graxos livres insolúveis que podem ser precipitados da parte líquida; separar os sólidos precipitados do glicerol bruto através de centrifugação a 5000 rpm; adicionar nutrientes (como sais minerais e fonte de nitrogênio), mais água para ajustar o meio nutricional (inclusive o glicerol) a um nível desejado.

Pyle et al. (2008) realizou o mesmo pré-tratamento, diferindo apenas no valor do pH ajustado com o ácido clorídrico, que neste caso foi de 3. O metanol, que evapora a 65°C, foi removido através de evaporação na autoclave a 121°C por 15 minutos (PYLE; GARCIA; WEN, 2008). Este procedimento foi também aplicado no trabalho de Athalye et al (2009), que conseguiu remover completamente o metanol da sua amostra.

O tratamento aplicado por Liang et al. (2010) ajustou o pH para 1 e em seguida centrifugou o glicerol a 4000 g por 20 minutos, depois disso, a fase superior, de cor vermelho escuro, foi identificada como os ácidos graxos livres. Dessa forma foi possível estimar e remover o sabão presente no glicerol. Já Ethier et al (2011) realizou um processo de tratamento semelhante aos de Pyle et al. (2008) e Chi et al. (2007), entretanto, para separar a fase de ácidos graxos livres do glicerol, a parte líquida precipitada foi mantida estática por 30 minutos para permitir a separação de fases (decantação) e depois foi removida com funil (ETHIER et al., 2011).

Pott et al. (2014) procedeu com a purificação do glicerol bruto da seguinte forma: reduziu o pH do glicerol para 1 através de adição de ácido clorídrico a 12 M e remoção da fase de ácidos graxos livres através de centrifugação a 5000 g por 5 minutos; aumento do pH do fluido rico em glicerol remanescente para 7 com hidróxido de sódio a 3 M, adição de volume de etanol igual ao volume de glicerol e resfriamento da mistura a 4°C; centrifugação a 5000 g por 10 minutos para remover demais sais precipitados; evaporação do etanol e do metanol através de aquecimento em banho maria a 90°C de um dia para o outro; adição de carvão ativado ao glicerol restante a um raio de 1 g de carvão para 100 ml de glicerol, isso foi agitado por 2

horas, centrifugado a 5000xg por 5 minutos e o sobrenadante filtrou-se através de um filtro de seringa de 0,44 µm para remover as partículas de carbono restantes (POTT; HOWE; DENNIS, 2014).

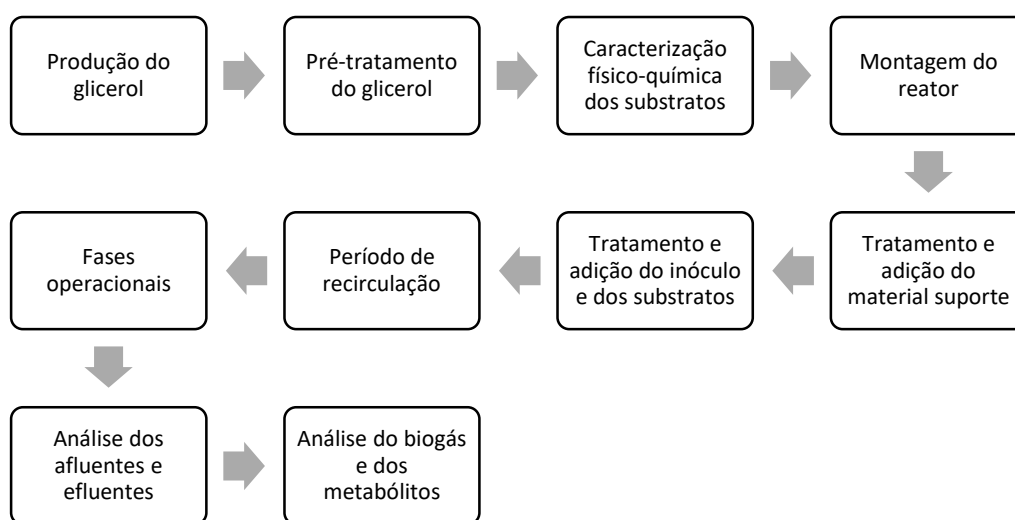
4 METODOLOGIA

Neste item são apresentados os substratos utilizados como matéria-prima para a produção de gás hidrogênio e sua caracterização físico-química, a fonte de inóculo com o tratamento pelo qual passou antes de ser utilizada e sua caracterização, o material suporte empregado para aderir a biomassa; as principais configurações, modo operacional, testes iniciais e partida do RALF, e como se deu a adição de um meio nutriente aos substratos.

O reator anaeróbico de leito fluidificado foi instalado e operado no anexo do Laboratório de Controle Ambiental (LCA) – FORPETRO, localizado no Centro de Tecnologia (CTEC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – Campus A/C Simões. O desenvolvimento do trabalho se deu em quatro laboratórios do CTEC: preparação do glicerol no Laboratório de Sistemas de Separação e Otimização de Processos (LASSOP), análises físico-químicas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), análises cromatográficas no Laboratório de Controle Ambiental (LCA).

O Fluxograma apresentado na Figura 4 resume as atividades desenvolvidas nesta pesquisa.

Figura 4 – Fluxograma das atividades desenvolvidas durante o estudo.



Fonte: Autora (2019).

4.1 Substratos

O substrato utilizado para a fermentação, com o objetivo de produzir hidrogênio, é uma mistura de melaço de cana-de-açúcar e glicerol bruto, ambos subprodutos de produção de biocombustíveis. A proporção dos substratos será apresentada no item condições operacionais.

4.1.1 Melaço

O melaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi coletado no dia 23 de outubro de 2017 na usina Caeté S/A – unidade Cachoeira (Benedito Bentes, Maceió/AL), produtora de açúcar, etanol, bioeletricidade e derivados de cana-de-açúcar.

4.1.2 Glicerol Bruto

- Óleo de soja

Com o objetivo de ter maior controle sobre a composição do glicerol bruto a ser utilizado no reator, o mesmo foi produzido no Laboratório de Sistemas de Separação e Otimização de Processos (LASSOP) através de reação de transesterificação de óleo de fritura reaproveitado do Restaurante Universitário da UFAL, que utiliza óleo de soja refinado para fritura de seus alimentos.

Óleos residuais provenientes de processos de frituras precisam ser caracterizados pela variação significativa na quantidade de água, materiais sólidos, compostos polares e ácidos graxos livres (JORGE et al., 2005). Assim, todo o óleo utilizado passou primeiramente por um tratamento de filtração e secagem, para eliminar resíduos. Em seguida, foram analisados o índice de acidez e a umidade do óleo.

O índice de acidez indica a quantidade de ácidos graxos livres presentes em uma determinada amostra, sendo geralmente demonstrado como porcentagem em relação à massa de ácido oleico na amostra. Óleos com índice de acidez menores a 1% não necessitam de pré-tratamento. Os óleos com índices entre 1 e 5% necessitam de um pré-tratamento, desde que avaliado seu custo-benefício. Por fim, para valores acima de 5%, o pré-tratamento é indispensável (AHN et al., 1995).

O índice de acidez do óleo de fritura coletado no RU da UFAL foi determinado, em triplicata, de acordo com a ASTM D555-95(2017) (ASTM, 2017). O óleo analisado apresentou

índices elevados de acidez, próximos de 6%, que de acordo com a literatura iria exigir um processo de pré-tratamento (AHN et al., 1995). Para reduzir este índice, foi feita uma mistura do óleo residual com óleo novo, e a proporção que apresentou os melhores índices de acidez foi a de 25% de óleo de fritura usado com 75% de óleo de soja novo, mistura utilizada para o processo de transesterificação.

Também foi realizada uma análise da quantidade de água presente no óleo, quantificação importante, pois a água, durante a reação de produção de biodiesel, pode levar os ácidos graxos livres a produzirem sabão (SILVA, 2018). Assim, com o auxílio de uma balança de secagem (marca Marconi, modelo ID 50), foi possível determinar que o teor de umidade da mistura de óleo utilizada como matéria-prima para produzir o glicerol foi de aproximadamente 0,59%. Com o objetivo de evitar que esta umidade levasse à produção indesejada da impureza sabão, o óleo foi deixado em estufa a 60°C por um período de 24 horas antes de ser utilizado.

- Reações de transesterificação

Para produzir o glicerol, foi empregada a proporção molar 1:3 de óleo para álcool. Porém, como se trata de uma reação reversível, foi utilizado excesso de metanol para direcionar a reação no sentido da produção de biodiesel, assim, em cada reação o metanol foi colocado na proporção 6:1, metanol para óleo. O catalisador adicionado às reações foi hidróxido de potássio (KOH), com quantidade de 1% em relação à massa de óleo.

Foi realizado um total de vinte reações de transesterificação na temperatura de 60°C, em um reator do tipo CSTR de 1,5 L de capacidade total utilizado no modo batelada, com agitador a 350 rpm, mostrado na Figura 5. Para cada reação, o catalisador (KOH) foi previamente dissolvido no álcool (metanol) e o óleo, depois de pré-aquecido previamente no reator, recebeu a mistura de hidróxido de potássio e metanol, dando início à reação cronometrada durante 40 minutos.

Figura 5 – Reator CSTR utilizado para produção do biodiesel.



Fonte: Autora (2019).

Após cada reação, o biodiesel produzido foi despejado em um funil de separação para separá-lo do glicerol bruto. O glicerol corresponde à fase mais densa da separação, como pode ser visto na Figura 6. Com o auxílio de uma balança de secagem, foi estimada a quantidade de metanol presente no glicerol – considerando que seu ponto de ebulição é 65°C (PYLE; GARCIA; WEN, 2008).

Figura 6 - Separação biodiesel e glicerol bruto.



Fonte: Autora (2019).

De acordo com os métodos de pré-tratamento do glicerol bruto estudados, a remoção do metanol foi adaptada da metodologia proposta por Pyle et al. (2008). O glicerol foi colocado a 121°C e 40 rpm por 15 minutos em um rotavaporador (marca Fisatom, modelo 558). Para cada tratamento realizado, o tempo foi contado a partir do momento em que o recipiente de saída do rotavaporador começava a receber o metanol recuperado.

Com as vinte reações realizadas foi produzido um total de 3.307 g de glicerol bruto – 174 g por reação, em média. Com o auxílio de balança de secagem, considerando que o ponto de ebulição do metanol é 65°C (PYLE; GARCIA; WEN, 2008), o glicerol bruto foi analisado e foi possível estimar que a quantidade de metanol presente nele, ou seja, que não reagiu com o biodiesel produzido, foi de 27,6%.

Após cada reação, o biodiesel produzido era deixado em funil de separação para separar-se do glicerol, de forma que, se houvesse formação de sabão na reação, este seria visto nesta etapa, e formaria uma fase intermediária. Em nenhuma das 20 reações foi identificada a formação da impureza sabão.

- Pré-tratamento do glicerol bruto

Depois da produção do glicerol, se procedeu para seu pré-tratamento, que consistiu na remoção metanol em um aparelho de rotavaporação, de forma que o metanol removido das amostras foi recuperado e coletado em galão previamente utilizado para armazenar álcool metílico P.A. Após o pré-tratamento, o glicerol foi novamente analisado na balança de secagem e a quantidade de metanol presente diminuiu para 8,34%.

Com a remoção de metanol, a massa final de glicerol produzida também foi afetada, passando para 2598,7 g. Através dos procedimentos da norma D7777-13 (ASTM, 2013), foi estimada a densidade do glicerol bruto produzido: $1,08 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$ a 30°C, de forma que o volume de glicerol correspondente após o pré-tratamento foi de 2.806,6 mL.

4.2 Caracterização dos substratos

No presente trabalho, foi feita a caracterização físico-química do melão de cana-de-açúcar e do glicerol bruto empregados como substratos para a produção de hidrogênio.

4.2.1 Caracterização do melão

Os parâmetros caracterizados para o melão foram os de acidez (ácidos voláteis), alcalinidade, carboidratos, demanda química de oxigênio (DQO), fósforo total, nitrogênio total Kjeldahl (NTK), potencial hidrogeniônico (pH) e sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis). Todas as análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

4.2.2 Caracterização do glicerol bruto

Os parâmetros caracterizados para o glicerol bruto neste trabalho foram os de acidez (ácidos voláteis), alcalinidade, carboidratos, DQO, nitrogênio NTK, pH, quantidades de metanol e de resíduos de sabão e sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis). As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com o APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998). A quantidade de metanol foi estimada em balança de secagem e a quantidade de resíduos de sabão, durante a separação de fases biodiesel-glicerol.

4.3 Inóculo

O reator foi inoculado com lodo coletado de um reator UASB utilizado para tratar esgotos em um conjunto residencial (Tabuleiro dos Martins, Maceió/AL). O lodo foi coletado dia 25 de janeiro de 2018 e se manteve armazenado em freezer em modo de refrigeração com temperatura variando de 1 a 5°C.

Antes da inoculação no reator, foi realizado o pré-tratamento térmico desse lodo, a fim de eliminar micro-organismos metanogênicos, pois estes convertem o hidrogênio produzido – juntamente com o carbono do meio – em metano (BOSIO, 2014). A metodologia para o tratamento térmico do inóculo foi aquecer o lodo a 90°C por cerca de 10 minutos, e em seguida resfriá-lo em banho de gelo até atingir 25°C (MAINTINGUER et al., 2008).

O lodo utilizado tinha as seguintes características: 723 mg.L⁻¹ de carboidratos, 21.107 mg.L⁻¹ de DQO total, pH 7, e uma série de sólidos suspensos de 161.000 mg.L⁻¹ SST, 1.285 mg.L⁻¹ SSF e 159.715 mg.L⁻¹ SSV.

4.4 Material Suporte

O material suporte selecionado para imobilização de biomassa no reator anaeróbio de leito fluidificado foi pneu triturado. Tal material foi escolhido por apresentar um bom

desempenho para a produção de hidrogênio em trabalhos anteriores (BARROS, 2009; SILVA, 2015; CHAVES, 2018). Resultados indicaram que sua rugosidade elevada permite um acúmulo maior de biomassa aderida em relação a outros materiais como poliestireno e PET, por exemplo, e conseqüentemente, uma maior quantidade de bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio.

Além disso, trata-se de um material com facilidade de acesso e baixo custo. As tiras de pneu, cortadas manualmente com tesouras em pedaços de aproximadamente 3 a 5 mm, foram providenciadas em uma empresa recauchutadora de pneus na cidade de Maceió – AL.

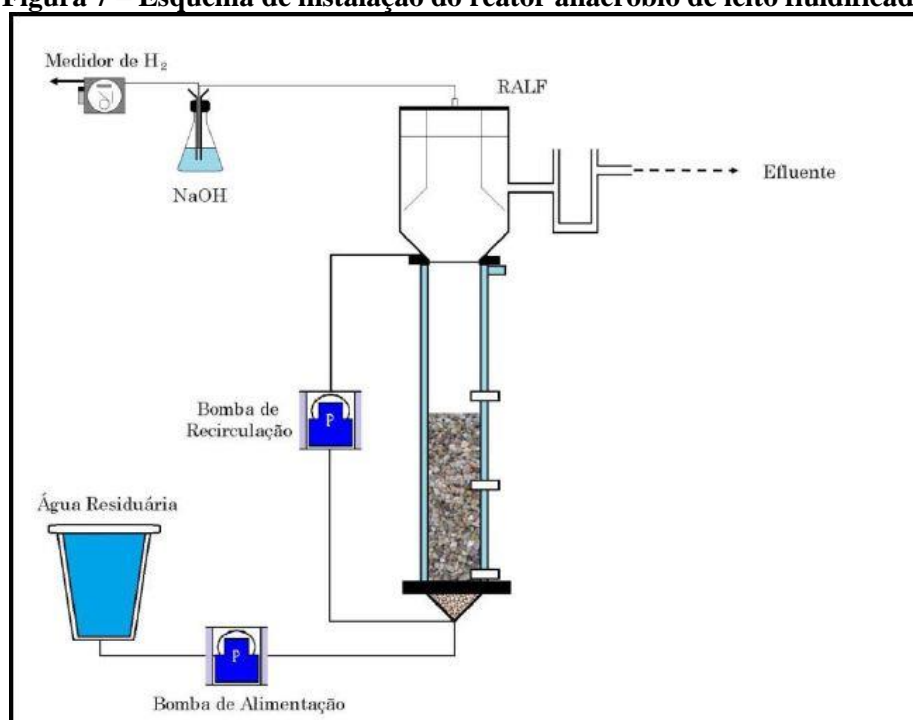
Para retirar resíduos de óleo e outras impurezas contidas nas tiras de pneu, foi realizado um processo de limpeza e tratamento: as partículas de pneu triturado foram mergulhadas em hidróxido de sódio ($7,5 \cdot 10^{-3}$ M) por 30 minutos, sendo em seguida lavadas com água e secas em estufa a 40°C. Tal procedimento se repetiu três vezes. Depois desse tratamento, houve um teste de seleção das partículas: estas foram colocadas em um recipiente com água, de forma que as partículas que apresentaram densidade maior que a água – e portanto, afundaram – foram selecionadas para serem utilizadas no reator, e as partículas que flutuaram foram descartadas (BARROS, 2009).

4.5 Reator anaeróbio de leito fluidificado

O reator utilizado para a produção de hidrogênio foi o anaeróbio de leito fluidificado (RALF). Este tipo de reator utiliza material de preenchimento inerte a fim de agregar biomassa e os micro-organismos se desenvolverem aderidos a esse material suporte, que é mantido suspenso devido ao movimento ascendente vertical da massa líquida dentro do reator (BUSATO, 2004).

Para sua operação, o reator foi instalado junto com uma caixa armazenadora do fluido afluente, uma bomba de alimentação, uma bomba de recirculação, um ponto de coleta de efluente e um medidor de gás (MilliGas-Counter, fabricante Ritter), como ilustrado na Figura 7. O reator foi confeccionado em acrílico transparente com 115,0 cm de altura, 5,0 cm de diâmetro interno e 11,0 cm de diâmetro externo.

Figura 7 – Esquema de instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.



Fonte: Amorim (2009).

4.6 Montagem e inoculação do reator

Depois da montagem do reator, foi realizado um teste de estanqueidade para detectar possíveis vazamentos, de forma que a quantidade de água utilizada para preencher o reator correspondeu ao volume total do reator. Em seguida, o reator foi preenchido com o material suporte até uma altura de aproximadamente 33 cm – metade da altura da zona reacional do reator (AMORIM, 2009), e o volume de água utilizado para encher o reator nesta situação correspondeu ao volume útil do reator.

O próximo passo foi ajustar as condições fluidodinâmicas do reator. Para isso, foi utilizado o dado experimental de velocidade mínima de fluidificação para partículas de pneu triturado – $V_{mf} = 1,18 \text{ cm.s}^{-1}$ (BARROS, 2009) – e, com isso, tem-se que a velocidade de recirculação do inóculo deve ser 30% maior que a V_{mf} totalizando $1,534 \text{ cm.s}^{-1}$ (AMORIM, 2009; REIS, 2010; BARROS, 2012).

Dessa forma, multiplicando a área da base do reator pela velocidade de recirculação do inóculo, tem-se a vazão de recirculação ($1,8 \text{ L.min}^{-1}$). Esta vazão foi ajustada na bomba de recirculação presente na instalação do reator para recircular o inóculo entre o barrilete de

entrada e o reator em modo batelada por 48 h, sem que haja alimentação do reator com substrato afluente.

4.7 Condições operacionais

O reator foi operado de forma contínua, sendo alimentado diariamente com os substratos melão e glicerol bruto diluídos em temperatura ambiente. A metodologia seguida foi adaptada do trabalho de Lopes *et al* (2017), que operou um reator granular de leito expandido (EGSB) com soro de queijo e glicerol bruto como substratos para a produção de hidrogênio e ácido propiônico (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017).

Como pode ser visto na Tabela 7, a concentração afluente de melão foi mantida constante em 4 g.L^{-1} , já o glicerol bruto teve sua concentração variada da seguinte forma: 1, 2 e 3 e 0 g.L^{-1} , isto com o TDH de 4h sendo aplicado de forma constante. A última fase, sem glicerol, foi escolhida a partir dos resultados de produção de hidrogênio obtidos nas fases anteriores.

Tabela 7 - Etapas de operação do reator.

Fase	Parâmetro variável	TDH _{teórico} (h)	Concentração M/GB (g.L^{-1})	Duração (dias)
1	Concentração dos substratos	4	4/1	44
2			4/2	31
3			4/3	24
4			4/0	86

M/GB: melão/glicerol bruto. Fonte: Adaptado de Lopes, 2017.

A operação do reator mudou de fase, ou seja, teve sua concentração de substratos afluentes alterada, quando o estado estacionário foi atingido no reator. Tal estado se verifica quando há estabilidade na eficiência de conversão da glicose e na formação dos produtos como ácidos orgânicos e hidrogênio (AMORIM, 2009). O estado estacionário é atingido quando as variações dos produtos e da concentração de biomassa forem menores que 10% (ZHANG *et al.*, 2007).

4.8 Suplementação nutricional

A princípio, se verificou se havia ou não necessidade de suplementar o reator com nutrientes. Assim, na primeira fase operacional, em que foi adotada a proporção melaço:glicerol de 4:1 e tempo de detenção hidráulica (TDH) de quatro horas, não houve adição de nutrientes na alimentação diária do reator.

Na segunda fase operacional, com proporção melaço:glicerol de 4:2 e TDH de 4 horas, durante os dez primeiros dias de operação não houve suplementação de nutrientes na alimentação. Após esse período os afluentes passaram a ser suplementados com um meio nutricional adaptado do proposto por Del Nery (Tabela 8), que estudou um substrato sintético cuja DQO adotada foi de 2.000 mg.L⁻¹ (DEL NERY, 1987). A adição destes nutrientes tem como objetivo assegurar o bom crescimento bacteriano e melhores condições para a atividade das hidrogenases (LOPES, 2015).

Tabela 8 – Meio nutricional Del Nery adaptado.

Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto férrico	0,5
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de sódio dibásico	33,4
Sulfato ferroso	5,0
Sulfato de níquel	1,0
Uréia	125,0

Fonte: Del Nery (1987).

4.9 Análises físico-químicas e monitoramento

Durante todo o experimento, foram realizadas coletas periódicas do afluente e do efluente do reator anaeróbio, bem como do biogás produzido, para realização de análises físico-químicas e de monitoramento, de acordo com a frequência e com as metodologias mostradas na Tabela 9.

As análises de pH, DQO e sólidos foram feitas de acordo com o APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998). Já o teor de carboidratos totais foi analisado pelo método colorimétrico desenvolvido por Dubois *et al.* (1956), que se baseia

no fato de que açúcares e seus derivados, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, ficam com coloração amarelo-alaranjada;

Tabela 9 – Análises e monitoramento do reator.

Análise	Amostra	Frequência	Método	Metodologia
pH	Afluente e Efluente	5x/semana	Eletrométrico	(APHA, 1998)
DQO	Afluente e Efluente	2x/semana	Colorimétrico	(APHA, 1998)
Sólidos (SST, SSV, SSF)	Afluente e Efluente	2x/semana	Gravimétrico	(APHA, 1998)
Carboidratos totais	Afluente e Efluente	2x/semana	Colorimétrico	(DUBOIS et al., 1956)
Alcalinidade e ácidos voláteis	Afluente e Efluente	2x/semana	Titulométrico	(APHA, 1998)
Ácidos voláteis e álcoois	Efluente	2x/semana	Cromatografia gasosa / amostragem automática	-
Composição do biogás	Saída de biogás	2x/semana	Cromatografia gasosa	(MAINTINGUER et al., 2008)
Volume de H ₂	Saída de biogás	2x/semana	Medidor online de gás (milligasCounter, Ritter)	
Monitoramento	Amostra	Frequência	Material	
Vazão	Efluente	5x/semana	Balde e cronômetro	
Temperatura ambiente	-	5x/semana	Termômetro	
Altura do leito	-	5x/semana	Trena	

Fonte: Autora (2019).

Para as análises com as amostras afluentes ao reator, ou seja, com as diluições de melão e glicerol bruto de acordo com cada fase de operação, foi feita uma média do parâmetro (pH, DQO, sólidos, carboidratos, alcalinidade, ácidos) entre o afluente colocado no reator no dia “n” com o afluente que havia sido colocado no reator no dia “n-1”. Isto foi feito para considerar possíveis variações de resultados dos parâmetros caudadas por fenômenos de fermentação em um período de 24h.

4.9.1 Análise da composição do biogás

A composição do biogás (H₂, CO₂ e CH₄) produzido no reator foi detectada por cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia aplicada por Maintinguer *et al.* (2008). Para a análise foram ser retiradas amostras de 1 ml da fase gasosa do *headspace* do reator em operação, com o auxílio de seringa *gastight* com trava, que posteriormente era inserida no

cromatógrafo para determinação dos gases produzidos. A área de gás hidrogênio lida nas curvas geradas pelo *software* do cromatógrafo resulta na quantidade de mols deste gás. Assim, através da Equação 17 mostrada no Tópico 4.10, foi possível calcular o rendimento de hidrogênio (HY);

Estas análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso de alta resolução, da marca Shimadzu[®], modelo GC 2010, munido de detector de condutividade térmica (TCD), com as seguintes configurações:

- ✓ Coluna CarboxenTM 1010 PLOT com capilar de sílica fundida (30m x 0,53mm);
- ✓ Temperaturas do injetor, detector e coluna = 30, 200 e 230 °C, respectivamente;
- ✓ Fluxo do gás de arraste (argônio): 21,9 cm.s⁻¹;
- ✓ Tempo total de análise: 6,87 min.

Já o volume de hidrogênio foi quantificado através de um sistema composto por um medidor *online* de gás – MilliGas-Counter, fabricante Ritter – e um recipiente contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) com concentração de 5 mol.L⁻¹. O hidróxido de sódio retém o conteúdo de gás carbônico do biogás, deixando passar apenas o hidrogênio. A vazão volumétrica de hidrogênio é obtida com a média aritmética do volume de gás H₂ medidos consecutivamente durante um minuto cada medida. A partir disso, com a Equação 18 apresentada no Tópico 4.10 foi possível calcular a taxa de produção de hidrogênio (HPR) (PEIXOTO, 2008).

4.9.2 Análise dos metabólitos solúveis

Os metabólitos solúveis produzidos no reator – ácidos orgânicos voláteis e álcoois – foram analisados no cromatógrafo SHIMADZU LC-20AT, localizado no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco.

Sua determinação foi executada com as seguintes especificações no aparelho utilizado: Coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura do forno 64°C, fluxo da fase móvel (ácido sulfúrico 5mM) 0,8 ml.min⁻¹, volume de injeção 100 µL e as análises foram processadas no *software* LabSolutions. As amostras, de 1,5 ml cada, foram previamente filtradas com filtros de seringa de celulose regenerada de 0,45 µm.

Os álcoois cuja produção foi possível avaliar foram etanol, metanol e 1,3-propanodiol, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de índice de refração.

Já para a determinação dos ácidos voláteis produzidos o aparelho utilizado foi o mesmo, mas por método de quantificação de ácidos graxos voláteis (AGV), usando para isso um detector UVvis DAD com comprimento de onda 208 nm. Foi possível avaliar a produção dos ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico.

4.10 Cálculo dos principais parâmetros

- Rendimento de hidrogênio:

$$HY(\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}) = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (mol)}}{\text{Quantidade de glicose consumida (mol)}} \quad (17)$$

- Produção volumétrica de hidrogênio:

$$\text{HPR}(\text{L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{Reator}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (L)}}{\text{Tempo (h)} \times \text{Volume útil do reator (L)}} \quad (18)$$

- Vazão teórica:

$$\text{Vazão}_{\text{Teórica}}(\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{Volume útil do reator (ml)}}{\text{TDH}_{\text{Teórico}}(\text{h})} \quad (19)$$

- Tempo de detenção hidráulica real:

$$\text{TDH}_{\text{Real}}(\text{h}) = \frac{\text{Volume útil do reator (ml)}}{\text{Vazão}_{\text{Real}}(\text{ml} \cdot \text{h}^{-1})} \quad (20)$$

- Conversão de carboidrato:

$$\text{Conversão de carboidrato}(\%) = \frac{100 \times (\text{carboidrato}_{\text{afluente}} - \text{carboidrato}_{\text{efluente}})}{\text{carboidrato}_{\text{afluente}}} \quad (21)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico são apresentados os resultados e a discussão destes ao longo da operação do RALF alimentado com glicerol bruto e melão como substratos. São descritas as caracterizações dos substratos e dados de monitoramento do reator, como temperatura ambiente, vazão de operação e pH.

Em seguida, estão descritos os resultados referentes à remoção de DQO e carboidratos totais, concentrações de sólidos suspensos; rendimento e produção volumétrica de gás hidrogênio, conteúdo do biogás produzido, além das concentrações de produtos solúveis gerados durante a operação do reator. Os resultados estão apresentados em tabelas com seus valores médios em cada fase de operação e em gráficos em função do tempo.

5.1 Caracterização dos substratos

5.1.1 Caracterização do melão

O trabalho de Chaves (2018), realizado na UFAL, utilizou melão como substrato para a produção de hidrogênio em um reator do tipo RALF. A Tabela 10, apresenta a caracterização do melão bruto realizada por Chaves (2018) e pelo presente trabalho:

Tabela 10 – Caracterização do melão bruto.

Parâmetro (mg.L⁻¹)		Presente trabalho, 2019	(CHAVES, 2018)
Alcalinidade a CaCO ₃	Parcial	2.203	450
	Intermediária	10.469	6.000
	Total	12.672	6.450
Ácidos voláteis		24.480	17.370
Carboidratos totais		970	970
DQO _{total}		1.130.812	1.088.760
Fósforo		625	460
Nitrogênio NTK		9.603	31.400
pH		6	6
Sólidos suspensos	Totais	13.300	10.050
	Voláteis	12.150	8.650
	Fixos	1.150	1.400

Fonte: Autora (2019).

É possível verificar, com base nos resultados encontrados neste estudo, e comparando-os aos de Chaves (2018) e aos demais trabalhos encontrados na literatura (Tabela 2), que há bastante variabilidade nas características do melaço de cana-de-açúcar. O pH, por exemplo, variou nos trabalhos citados na literatura, de 3,45 e 4,30. Já o melaço caracterizado neste trabalho teve o pH um pouco mais elevado, de 5,60.

Como pode ser comprovado pelos dados apresentados na Tabela 2, o melaço é rico em carboidratos totais, com concentrações entre 964.800 e 614.000 mg.L⁻¹ reportadas na literatura – Albanez et al. (2016) e Park et al. (2010) – e a uma concentração inferior, de 970 mg.L⁻¹ no caracterizado no presente trabalho.

O melaço de cana-de-açúcar contém alta concentração de matéria orgânica, com uma DQO que atinge concentrações próximas a 1.100.000 mg.L⁻¹ na literatura – Albanez et al. (2016); Park et al. (2010) e Tunçay et al. (2017). Esta característica se confirmou na caracterização realizada no melaço estudado neste trabalho – 1.130.812 mg.L⁻¹, bastante próxima à relatada por Chaves (2018) – 1.088.760 mg.L⁻¹.

A alcalinidade total a carbonato de cálcio foi um parâmetro com concentrações muito variáveis na literatura e na presente caracterização, com valores entre 5.900 e 27.000 mg.L⁻¹ nos trabalhos de Park et al. (2010) e Tunçay et al. (2017), e valor de 12.672 mg.L⁻¹ no melaço estudado. A alcalinidade total obtida neste trabalho, por sua vez, foi quase duas vezes superior à encontrada por Chaves (2018) – 6.450 mg.L⁻¹. Já a acidez do substrato apresentou concentração de 24.480 mg.L⁻¹ na caracterização realizada pelo presente trabalho, e de 17.370 mg.L⁻¹ quando caracterizada por Chaves (2018). A série de sólidos suspensos teve concentrações por volta de 10.000 mg.L⁻¹ neste trabalho e por Chaves (2018), sendo próximos dos encontrados por Park et al. (2010).

O melaço é também um substrato rico em nutrientes, característica percebida pelas concentrações de fósforo (625 e 460 mg.L⁻¹) encontradas neste trabalho e por Chaves (2018), que utilizou o mesmo substrato, valores consistentes com os relatados na literatura (1.100 e 590 mg.L⁻¹) (PARK et al., 2010; REGO, 2016). Outro nutriente presente é o nitrogênio total Kjeldahl (NTK), com concentração de 9.600 mg.L⁻¹ neste trabalho e 31.400 mg.L⁻¹ por Chaves (2018). Valores intermediárias são relatados em outros trabalhos da literatura, com concentrações da ordem de 15.000 mg.L⁻¹ (REGO, 2016; TUNÇAY et al., 2017).

5.1.2 Caracterização do glicerol bruto

O trabalho realizado por Santos (2017), realizado na UFAL, utilizou glicerol comercial (ou puro) e glicerol bruto coletados da empresa Granol Indústria Comércio e Importação S/A, localizada em Goiás, como substrato para a produção de hidrogênio em reatores operando em batelada. A Tabela 11, apresenta a caracterização do glicerol bruto realizada por Santos (2017), por Lovatel (2016) e pelo presente trabalho:

Tabela 11 – Caracterização do glicerol bruto.

Parâmetro (mg.L ⁻¹)		Presente trabalho, 2019	(SANTOS, 2017)	(LOVATEL, 2016)
Alcalinidade a CaCO ₃	Parcial	49.015		
	Intermediária	2.069	-	-
	Total	51.084		
Ácidos voláteis		13.464	-	-
Cálcio total		-	-	113
Carboidratos		12.550	16.676	-
Cloretos		16.896	-	-
DQO _{total}		2.171.026	1.356.808	868.840
Ferro total		-	-	0,87
Magnésio total		-	-	2.946
Metanol		27,6 ^a	-	-
Nitrogênio NTK		ND	-	66,41
pH		10,34	5	5,51
Potássio		-	-	7,12
Resíduos de sabão		ND	-	-
Sódio		-	-	24.854
Sólidos suspensos	Totais	850	-	-
	Voláteis	750	-	2.901
	Fixos	100	-	222

^aUnidade: em porcentagem; ND: Não Detectado. Fonte: Autora (2019).

A concentração de metanol estimada para o glicerol bruto produzido neste trabalho, de 27,6%, teve um valor bastante próximo do detectado pelo trabalho de Mangayil *et al.* (2012), de 30%. Os resíduos de sabão não foram detectados, pois ao esperar o biodiesel decantar e se separar do glicerol, não houve formação de fase intermediária de sabão.

O glicerol bruto produzido apresentou alcalinidade total a bicarbonato relativamente elevada, por volta de 50.000 mg.L⁻¹, e concentração de ácidos voláteis em torno de 13.400

mg.L⁻¹. O pH do glicerol gerado foi bastante alcalino, de 10,34, superior aos encontrados por Santos (2017) e por Lovatel (2016), ambos por volta de 5,0. Enquanto não há informações sobre a matéria prima utilizada para fabricar o glicerol utilizado por Santos (2017) e por Lovatel (2016), o presente trabalho utilizou como catalisador da reação de transesterificação o hidróxido de potássio (KOH), uma base forte, o que pode ter influenciado o alto valor de pH.

A concentração de DQO do glicerol bruto produzido foi significativa, de 2.170.000 mg.L⁻¹, valor superior ao encontrado por Santos (2017) – 1.360.000 mg.L⁻¹ e bastante superior ao relatado por Lovatel (2016) – 870.000 mg.L⁻¹. Já a concentração de carboidratos totais foi de 12.550 mg.L⁻¹, valor um pouco inferior ao reportado por Santos (2017), de 16.680 mg.L⁻¹.

5.2 Monitoramento do RALF

Os resultados apresentados a seguir referem-se ao monitoramento das condições operacionais do reator: temperatura ambiente, vazão e pH, sendo apresentados os valores médios acompanhados de seus respectivos desvios padrões.

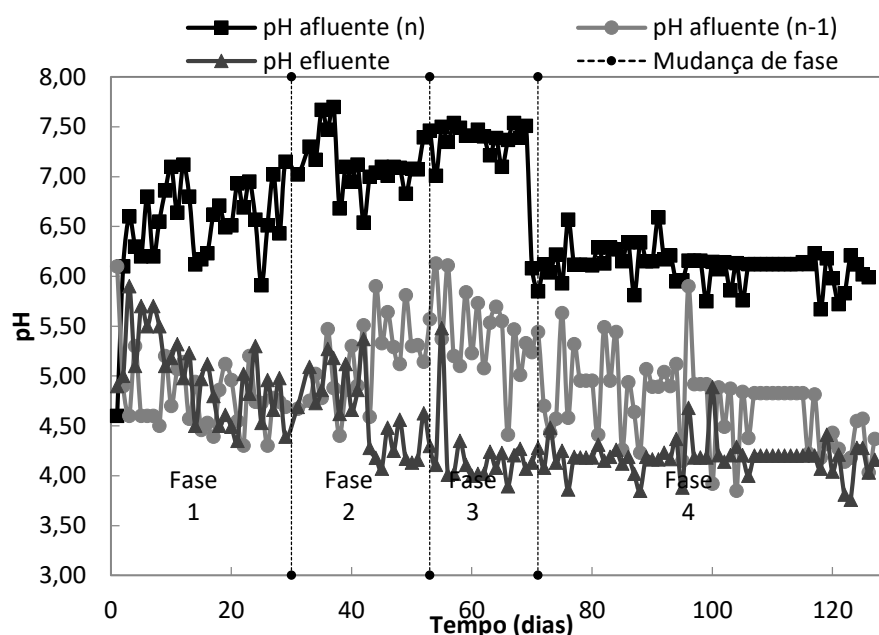
A Tabela 12 apresenta as vazões teóricas e reais médias aplicadas para o TDH de 4 h, correspondente a 3,94 ml.min⁻¹, aplicado durante as quatro fases de operação do reator, além dos valores médios de pH do afluente e efluente, assim como a temperatura ambiente. Em seguida, a variação de pH ao longo da operação do reator é mostrada na Figura 8, mostrando a diferença de pH no dia de alimentação do reator (n) e no dia anterior (n-1).

Tabela 12 – Condições operacionais do RALF durante as três primeiras fases operacionais.

Fase	Duração (dias)	N amostral	TDH (h) Aplicado	Vazão (ml.min ⁻¹)	T (°C)	pH	
						AF	EF
1	44	30	4,05 ± 0,25	3,90 ± 0,24	27,66 ± 0,99	5,65 ± 0,44	5,03 ± 0,40
2	31	23	4,05 ± 0,26	3,91 ± 0,26	26,43 ± 1,10	6,11 ± 0,35	4,62 ± 0,40
3	24	18	3,99 ± 0,26	3,96 ± 0,26	27,46 ± 0,93	6,41 ± 0,28	4,20 ± 0,34
4	86	57	4,13 ± 0,18	3,86 ± 0,18	28,54 ± 1,18	5,42 ± 0,30	4,18 ± 0,18

Fonte: Autora (2019).

Figura 8 - Perfil de dependência do pH ao longo da operação do RALF.



Fonte: Autora (2019).

A vazão afluyente ao reator foi próxima à desejada para obter o tempo de detenção hidráulica de 4 h ($3,94 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). O valor médio de vazão aplicada que mais diferiu do valor teórico ($4,13 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), ocorrido durante a quarta fase de operação do reator, é aproximadamente 5% superior ao valor teórico. Considerando uma margem de segurança de 10%, se pode concluir que o TDH de 4 h foi devidamente aplicado ao reator.

A temperatura ambiente variou entre $26,4^{\circ}\text{C}$ (2ª fase) e $28,5^{\circ}\text{C}$ (4ª fase), mantendo-se, portanto, com valores um pouco abaixo da faixa de temperatura mesofílica (30 a 40°), que é comumente utilizada em trabalhos operando reatores biológicos.

O pH afluyente e efluente não sofreu alterações muito bruscas ao decorrer das quatro fases, como pode ser visto pelos desvios padrões pequenos. Além disso, os valores de pH de afluyente velho e pH efluente mantiveram-se dentro de uma faixa amplamente reportada na literatura para a produção biológica de gás hidrogênio – $3,5 \leq \text{pH} \leq 5,5$ (CHAVES, 2018).

A partir da segunda fase experimental houve adição de nutrientes, o que não afetou significativamente os valores de pH, visto que estes se mantiveram semelhantes durante as quatro fases, entre 5,42 e 6,41 para pH do afluyente e entre 4,1 e 5,03 para pH do efluente. Durante as fases 1, 2 e 3, foi possível notar uma leve elevação do pH de alimentação, resultante

do aumento de glicerol na proporção de alimentação do reator - 1g.L^{-1} na primeira fase, 2g.L^{-1} na segunda e 3g.L^{-1} na terceira, já que o glicerol apresentou um pH consideravelmente elevado em sua caracterização (10,34).

5.3 Remoção da DQO

Na Tabela 13 constam os valores médios da DQO afluyente e efluente com os correspondentes desvios padrões, e os respectivos valores médios de remoção de DQO com seus desvios. Na Figuras 9 é mostrado o perfil de dependência da DQO contida no afluyente e efluente, e sua eficiência de remoção ao longo das fases de operação do reator. O afluyente presente no barrilete de alimentação desde o dia anterior (n-1), também teve sua DQO analisada, e apresentou, em média, uma concentração 30,72% inferior à DQO do afluyente de alimentação do substrato preparado para alimentar o reator no dia (n). Essa diminuição da DQO de um dia para o outro pode ser atribuída ao fato de utilizar-se, em grande parte na alimentação do reator (4 g/L), o melão – um efluente real, que possui características como rápida fermentação e acidificação (CHAVES, 2018).

A DQO afluyente teve seus valores médios variando entre $1,60\text{ g.L}^{-1}$ na fase 4, sendo esta a fase com menos matéria orgânica na alimentação (somente 4 g.L^{-1} de melão) e $6,33\text{ g.L}^{-1}$ na fase 3, a fase com maior concentração de matéria orgânica (4 g.L^{-1} de melão e 3 g.L^{-1} de glicerol), com um valor intermediário na fase 2 ($4,54\text{ g.L}^{-1}$), ou seja, a DQO afluyente aumentou gradualmente com a carga orgânica. Os valores médios de eficiência de remoção de DQO se mantiveram em torno dos 50% durante toda a operação do reator, valores superiores aos encontrados na literatura.

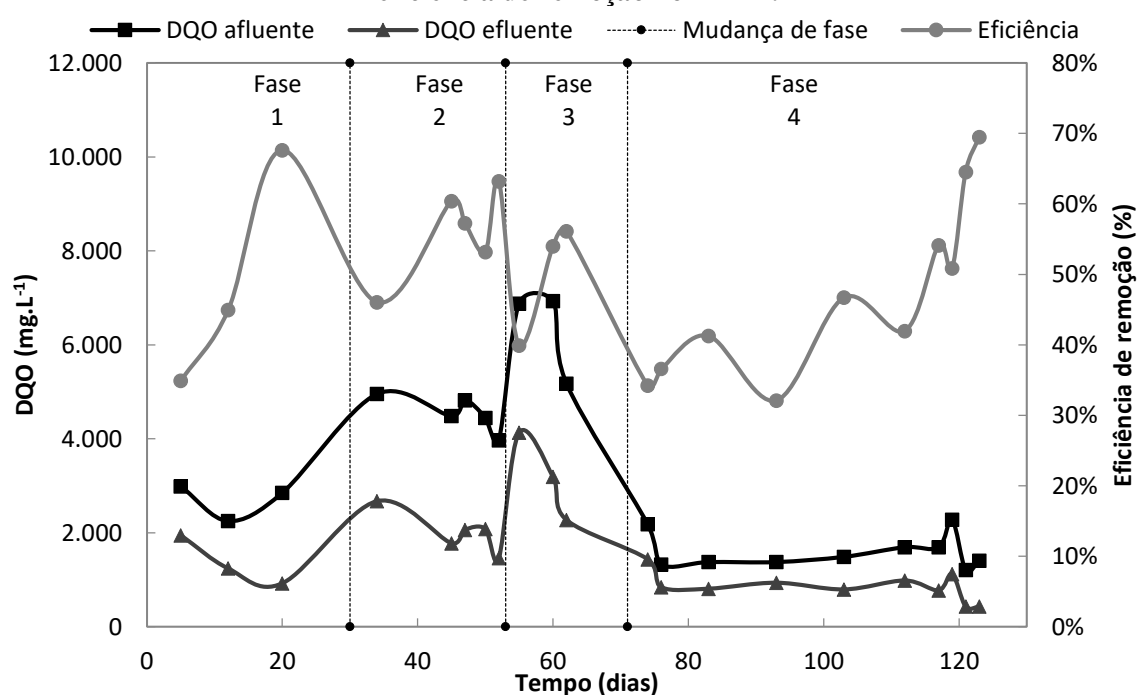
Outros autores que utilizaram a codigestão para produzir gás hidrogênio, obtiveram eficiências de remoção de DQO consideravelmente inferiores. Lopes et al. (2017), que trabalhou com glicerol bruto e soro de queijo em um reator EGSB, atingiu um valor máximo de 27%, já Albanez et al. (2016), que utilizou vinhaça e melão de cana-de-açúcar em um reator AnsBBR, alcançou a eficiência máxima de 24%. Lovato et al. (2017), que estudou os substratos glicerol bruto e soro de queijo em um AnsBBR, obteve remoções de DQO entre 21 e 25%.

Tabela 13 - Médias e desvios padrões de DQO afluente e efluente e de eficiência de remoção.

Fase	M/GB	N amostral	DQO _{afluente} (g.L ⁻¹)	DQO _{efluente} (g.L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)
1	4/1	3	2,70 ± 0,39	1,37 ± 0,52	49,14 ± 17
2	4/2	5	4,54 ± 0,38	2,01 ± 0,45	56,00 ± 7
3	4/3	3	6,33 ± 1,00	3,20 ± 0,93	50,00 ± 9
4	4/0	10	1,60 ± 0,36	0,86 ± 0,30	47,18 ± 13

M/GB = Concentração de melão/glicerol bruto em g.L⁻¹. Fonte: Autora (2019).

Figura 9 - Perfil de dependência de cada fase com a variação de DQO afluente e efluente e a sua eficiência de remoção no RALF.



Fonte: Autora (2019).

5.4 Conversão de Carboidratos

A Tabela 14 e a Figuras 10, apresentam a variação de carboidratos afluente e efluente com seus respectivos desvios padrões e a eficiência de conversão ao longo do tempo de operação do reator para cada fase.

O afluente apresentou uma concentração média de carboidratos totais entre $2,18 \pm 0,17$ g.L⁻¹ na quarta fase, em que o reator foi alimentado com menos quantidade de carga orgânica (4 g.L⁻¹ de melão e nada de glicerol) e $2,92 \pm 0,43$ g.L⁻¹ na terceira fase, a de maior carga orgânica (4 g.L⁻¹ de melão e 3 g.L⁻¹ de glicerol). O afluente presente no barrilete no dia anterior (n-1) apresentou, em média, uma concentração 52,80% inferior à do afluente no dia de alimentação do reator (n).

A eficiência de conversão de carboidratos foi aumentando ao longo do tempo. Nota-se que esta aumentou junto com a matéria orgânica de alimentação do reator – $35,68 \pm 5\%$ com a proporção 4/1, $65,46 \pm 15\%$ com a proporção 4/2 e $86,49 \pm 11\%$ com a proporção 4/3. E, na quarta fase de operação do reator, mesmo reduzindo a matéria orgânica afluyente para a proporção 4/0, o valor estabilizou um pouco acima do atingido na fase anterior, em $90,33 \pm 3\%$.

A conversão de carboidratos aumentou com o aumento da relação M:GB porque a maior disponibilidade de carboidratos (neste caso, provenientes do glicerol bruto) para o consumo microbiano favoreceu o processo de fermentação (RAMOS; SILVA; LUIS, 2018).

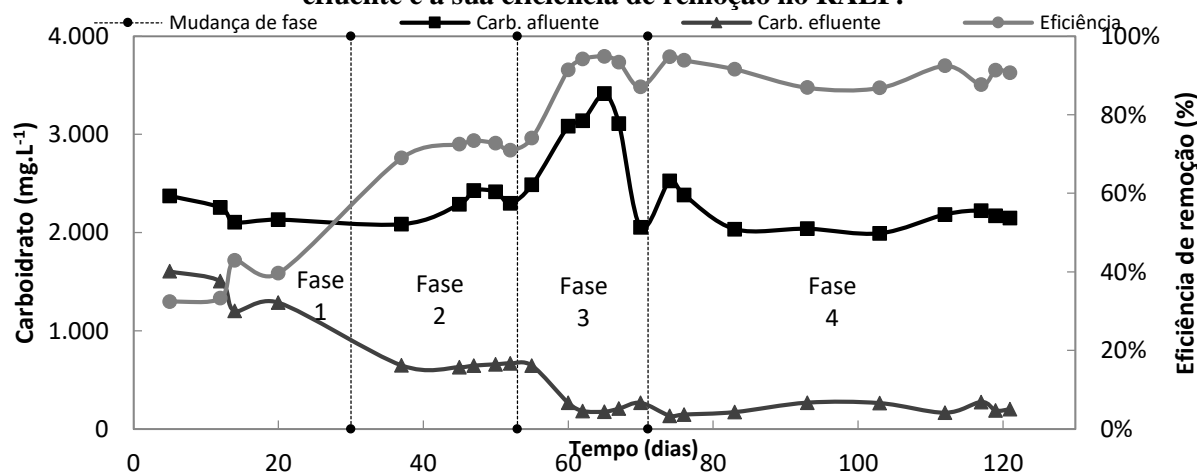
Estudos anteriores que utilizaram a codigestão para produzir hidrogênio comprovaram a elevada eficiência de conversão de carboidratos encontrada neste trabalho. Wu et al. (2013) atingiu um valor máximo de 95% com os substratos melão proveniente de beterraba e adubo de suinocultura em um reator ASBR, mesmo valor registrado por Albanez et al. (2016). Já Lopes et al. (2017) e Lovato et al. (2017) apontaram valores máximos de 98%.

Tabela 14 - Médias e desvios padrões de carboidrato afluyente e efluyente e de eficiência de remoção.

Fase	M/GB	N amostral	Carboidrato AF (g.L ⁻¹)	Carboidrato EF (g.L ⁻¹)	Degradação média (g.L ⁻¹) AF - EF	Eficiência de remoção (%)
1	4/1	4	$2,23 \pm 0,12$	$1,43 \pm 0,17$	790,57	$35,68 \pm 5\%$
2	4/2	5	$2,27 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,29$	1496,16	$65,46 \pm 15\%$
3	4/3	6	$2,92 \pm 0,43$	$0,36 \pm 0,23$	2565,29	$86,49 \pm 11\%$
4	4/0	10	$2,18 \pm 0,17$	$0,21 \pm 0,55$	1968,26	$90,33 \pm 3\%$

M/GB = Concentração de melão/glicerol bruto em g.L⁻¹. Fonte: Autora (2019).

Figura 10 - Perfil de dependência de cada fase com a variação de Carboidrato afluyente novo e efluyente e a sua eficiência de remoção no RALF.



Fonte: Autora (2019).

5.5 Determinação de Sólidos Suspensos

A Tabela 15, a seguir, apresenta a concentração média de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) obtidas nas amostras de afluentes e efluentes durante a operação do reator. E na Figura 11 são mostradas as porcentagens de SSF e SSV em relação aos SST contidos nos efluentes em cada fase de operação. Em todas as fases de operação, os sólidos suspensos voláteis representaram a maior parte dos totais, com porcentagens entre 63 e 100%.

A partir da concentração de SSV é possível estimar a quantidade de biomassa despreendida das partículas de material suporte que é liberada do reator junto ao efluente (MARTINS, J. S.; AMORIM, 2016). Assim, as diferenças entre as quantidades de SSV no efluente e no afluente, que tiveram valores entre 121,07 e 326,06 mg.L⁻¹, indicam que houve uma quantidade considerável de biomassa do reator que se perdeu. Chaves (2018), ao operar um RALF com melaço pneu triturado como material suporte para produzir hidrogênio, teve uma diferença de $SSV_E - SSV_A$ semelhante à deste trabalho quando aplicou o TDH de 4 h (148,50 mg.L⁻¹).

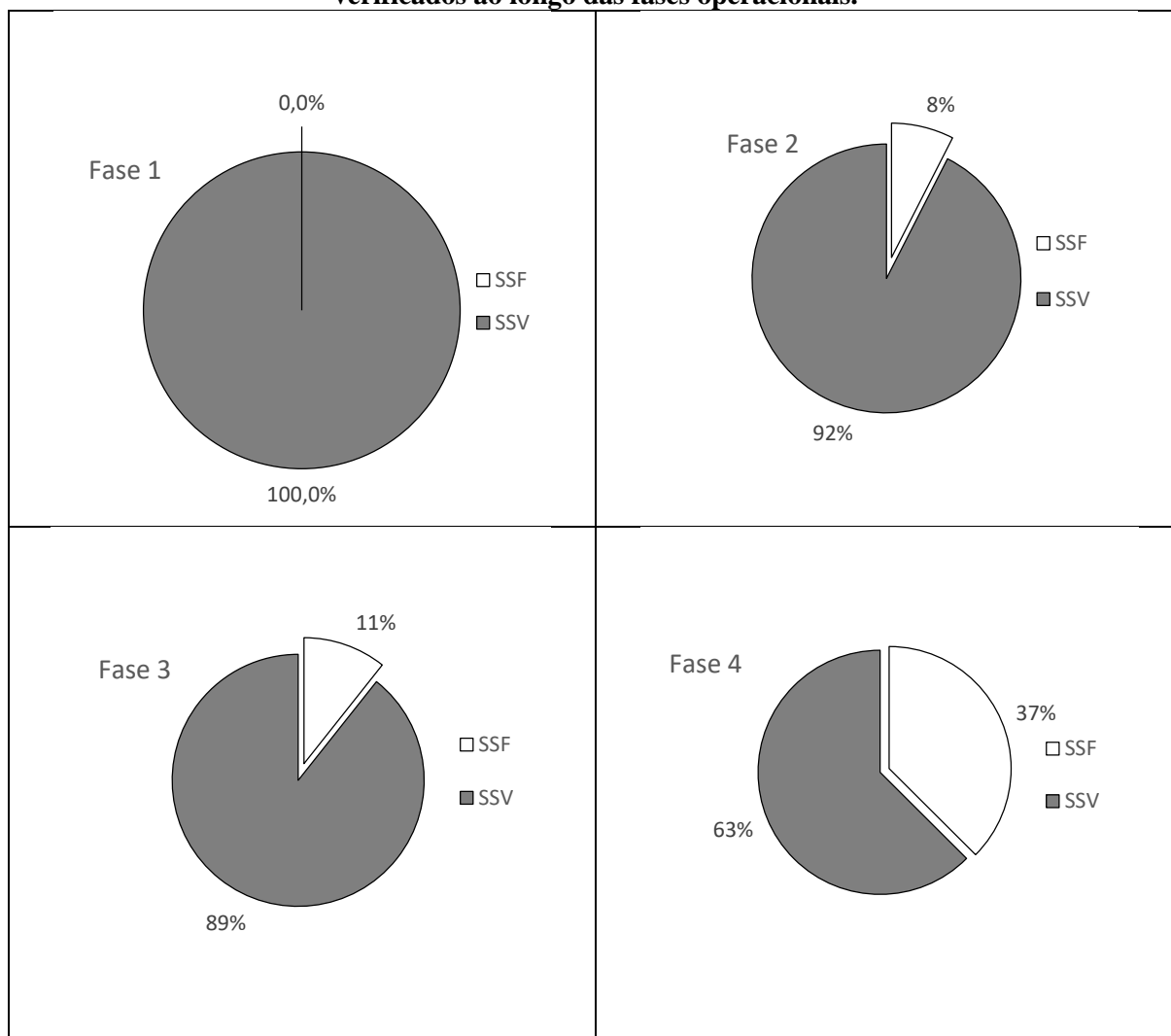
A partir dos resultados obtidos, nas fases 2 e 3, correspondentes às maiores quantidades de glicerol adicionadas ao reator, nota-se que foram responsáveis pela maior quantidade de biomassa no reator, como evidenciado pelos resultados de SSV_E nas referidas fases.

Tabela 15 - Variação da concentração de SST, SSF e SSV no afluente e no efluente durante a operação do reator.

Fase	M/GB	N amostral	Sólidos Suspensos (mg.L ⁻¹)						$SSV_E - SSV_A$
			Afluente (A)			Efluente (E)			
			SST _A	SSF _A	SSV _A	SST _E	SSF _E	SSV _E	
1	4/1	5	253,20	31,80	221,40	158,20	0,00	158,20	< 0
2	4/2	6	157,50	27,67	129,83	492,90	37,02	455,89	326,06
3	4/3	6	379,90	100,45	279,45	554,72	59,21	495,51	216,06
4	4/0	10	34,60	7,90	26,70	236,33	88,55	147,77	121,07

M/GB = Concentração de melaço/glicerol bruto em g.L⁻¹. Fonte: Autora (2019).

Figura 11 - Porcentagens médias de sólidos suspensos fixos e voláteis nos efluentes do RALF verificados ao longo das fases operacionais.



Fonte: Autora (2019).

5.6 Produção de Hidrogênio

Neste tópico são expostos os rendimentos, as produções volumétricas e o conteúdo de hidrogênio no biogás produzido ao longo das quatro fases operacionais do RALF.

5.6.1 Rendimento de Hidrogênio (HY)

Na Figura 12 é mostrada a média dos dados experimentais de rendimento de hidrogênio (HY) em cada fase operacional em condição de estado estacionário, os valores podem ser vistos na Tabela 16. O rendimento de hidrogênio teve valor máximo de $3,77 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ na quarta fase de operação do reator, em que o glicerol foi retirado da alimentação do reator. Seu valor foi um pouco inferior na primeira fase, que tinha $1 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{L}^{-1} - 2,11 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ e foi significativamente inferior nas fases com maior quantidade de glicerol no afluente – $0,45$ e $0,49 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ nas fases com 2 e 3 $\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Ao observar os resultados obtidos em cada fase, se nota que a quantidade de glicerol influenciou negativamente o rendimento de hidrogênio, de forma que o maior HY foi obtido na fase sem glicerol presente na alimentação do reator, seguido pelo valor referente à fase com a menor quantidade de glicerol aplicada. Já as fases com maiores quantidades de glicerol bruto provocaram quedas bruscas no rendimento de hidrogênio.

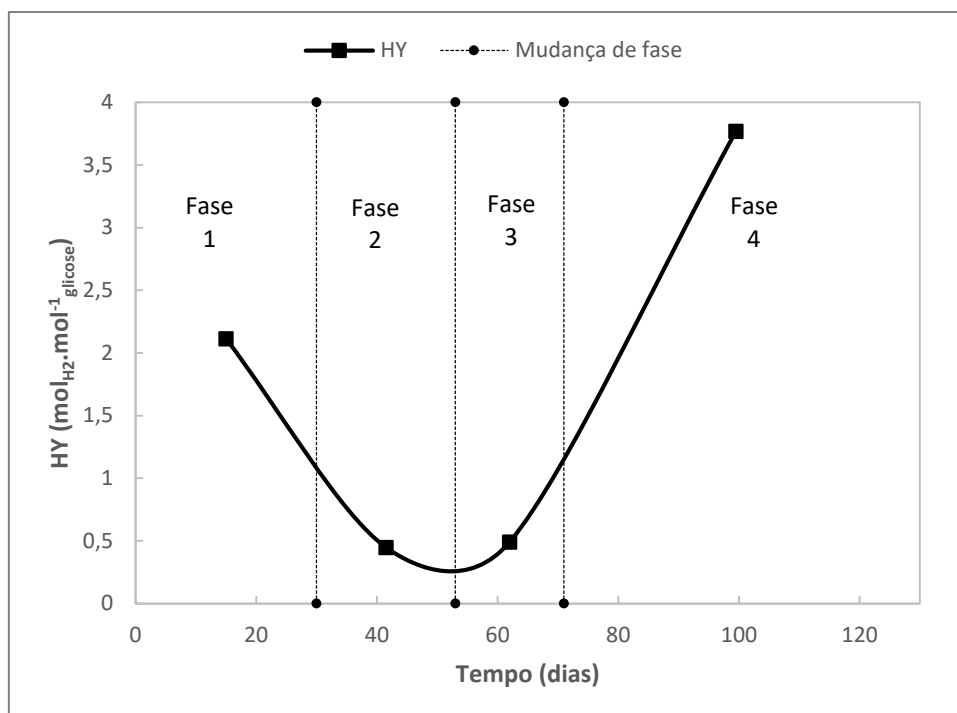
Ramos e Silva (2018) estudaram a produção de hidrogênio através da codigestão de vinhaça e soro de queijo em um reator tipo AFBR. Semelhante a este trabalho, um substrato foi mantido em proporção constante enquanto o outro teve sua proporção aumentada ao longo das fases operacionais (vinhaça 10 g.L^{-1} e soro de queijo aumentou de 2 a 10 gDQO.L^{-1}). O aumento nas concentrações de soro de queijo diminuiu os valores de rendimento de hidrogênio de um valor máximo de HY de $0,82 \pm 0,07 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$ com uma TCO afluyente de $36 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ até um ponto em que o hidrogênio parou de ser produzido.

Segundo Ramos e Silva (2018), o decréscimo de HY está associado ao aumento da taxa de carregamento orgânico (TCO) no reator, sugerindo que valores mais altos de TCO são desfavoráveis à comunidade microbiana, com o conseqüente acúmulo de ácidos graxos voláteis no reator. Este fator pode ter afetado a produção de hidrogênio neste trabalho, como será demonstrado pela produção de metabólitos solúveis na terceira fase, etapa com menor rendimento de hidrogênio, no tópico 5.7.

Lopes et al. (2017) trabalhou com um reator EGSB alimentado com soro de queijo e glicerol bruto para produzir hidrogênio. O maior HY, de $0,12 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$ foi observado na razão SQ/GB (soro de queijo/glicerol bruto) de 5:1. Trocando a razão SQ/GB para 5:2, 5:3, 5:4 e 5:5 aumentando a concentração de glicerol resultou em diminuir drasticamente a produção de hidrogênio, na proporção 5:5 HY foi $0,018 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$. Este padrão se repetiu neste trabalho.

Tapia-Venegas et al. (2015) observou que aumentando a porcentagem de glicerol na alimentação de um reator CSTR mesofílico ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) a um TDH de 12 h, o HY diminuiu de $6,1 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$ (100% glicose) para $3,2 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$ (100% glicerol).

Figura 12 – Rendimento de hidrogênio no RALF ao longo das fases operacionais.



Fonte: Autora (2019).

Tabela 16 – Valores médios do rendimento de hidrogênio (HY) em cada fase operacional.

Fase	N amostral	M/GB	HY (mol _{H₂} .mol _{glicose} ⁻¹)
1	6	4/1	2,11
2	3	4/2	0,45
3	5	4/3	0,49
4	6	4/0	3,77

M/GB = Concentração de melão / glicerol bruto em g.L⁻¹.

Fonte: Autora (2019).

6.2 Produção volumétrica de hidrogênio (HPR)

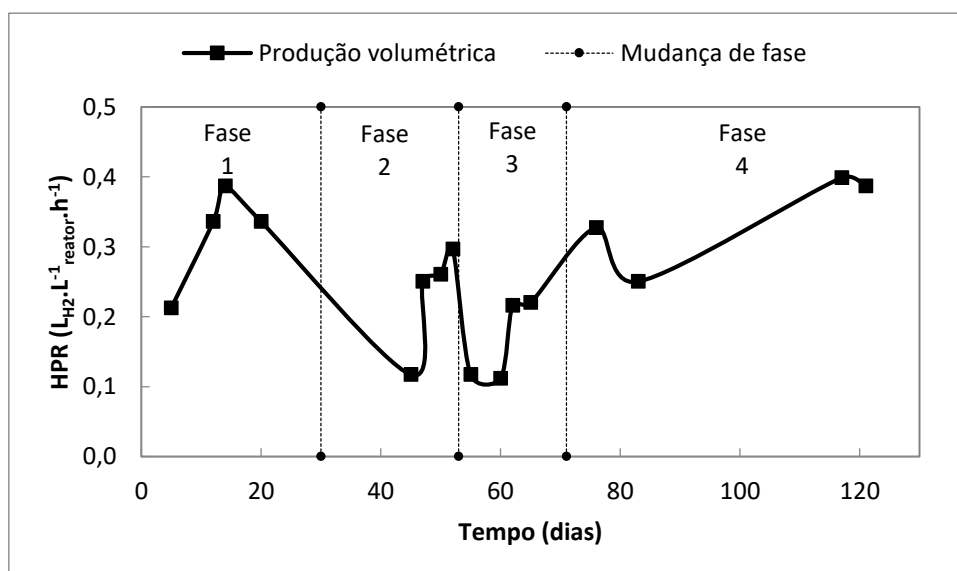
A Figura 13 apresenta o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) ao decorrer do tempo de operação do reator. E na Figura 14 e Tabela 17 estão os valores médios dos dados experimentais calculados sob condições de estado estacionário. Percebe-se que a fase com mais proporção de glicerol bruto afluente (3ª fase, 3 g.L⁻¹) teve metade da produção volumétrica de hidrogênio – $0,017 \pm 0,006 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$ – que a fase sem glicerol (4ª fase) – $0,34 \pm 0,07 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$, valor máximo.

De forma semelhante ao observado nos valores de rendimento de hidrogênio, a produção volumétrica foi diminuindo a medida que a proporção de glicerol foi aumentando na alimentação do reator. A fase com apenas 1 g.L⁻¹ de glicerol bruto obteve o segundo melhor resultado, com $0,32 \pm 0,07 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$.

Ramos e Silva (2018) detectaram um valor máximo de HPR de $0,059 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$ com a proporção soro de queijo/vinhaça em 2:10 g.L⁻¹ com o TDH de 8h aplicado. A medida que a proporção aumentou para 10:10 g.L⁻¹, a HPR diminuiu até não ser mais observada. Já Lopes et al. (2017) notaram uma queda expressiva nos valores de produção volumétrica de H₂ ao aumentar a proporção de glicerol bruto, na proporção soro de queijo/glicerol bruto de 5:1 obtiveram $0,0115 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$, já ao aumentar essa proporção para 5:5 esse valor caiu para $0,00315 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$.

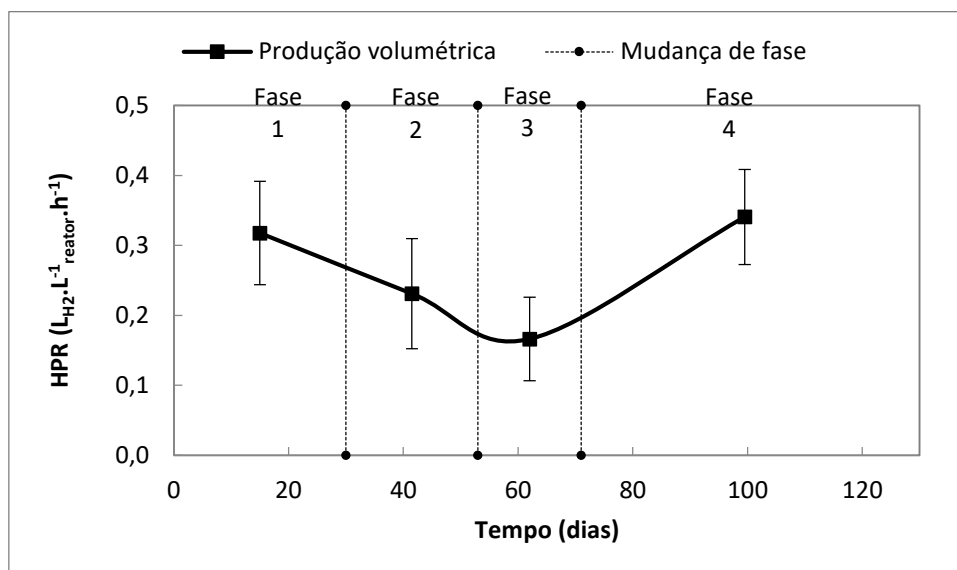
Tapia-Venegas et al. (2015) também perceberam variações nos valores de HPR em função da composição de alimentação do reator. A máxima produção de $0,0417 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$ foi alcançada com 60% de glicerol e 40% de glicose (5 g.L⁻¹). Entretanto, ao aumentar a proporção de glicerol para 100%, HPR caiu para $0,0247 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}} \cdot \text{h}^{-1}$.

Figura 13 – Perfil de dependência da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) ao longo do tempo de operação.



Fonte: Autora (2019).

Figura 14 – Produção volumétrica de hidrogênio no RALF ao longo das fases operacionais.



Fonte: Autora (2019).

Tabela 17 - Valores médios da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) em cada fase operacional.

Fase	N amostral	M/GB	HPR (L-H ₂ .L ⁻¹ _{reator} .h ⁻¹)
1	4	4/1	0,32 ± 0,07
2	4	4/2	0,23 ± 0,08
3	4	4/3	0,17 ± 0,06
4	4	4/0	0,34 ± 0,07

M/GB = Concentração de melaço / glicerol bruto em g.L⁻¹.
Fonte: Autora (2019).

5.6.3 Composição do biogás produzido no RALF

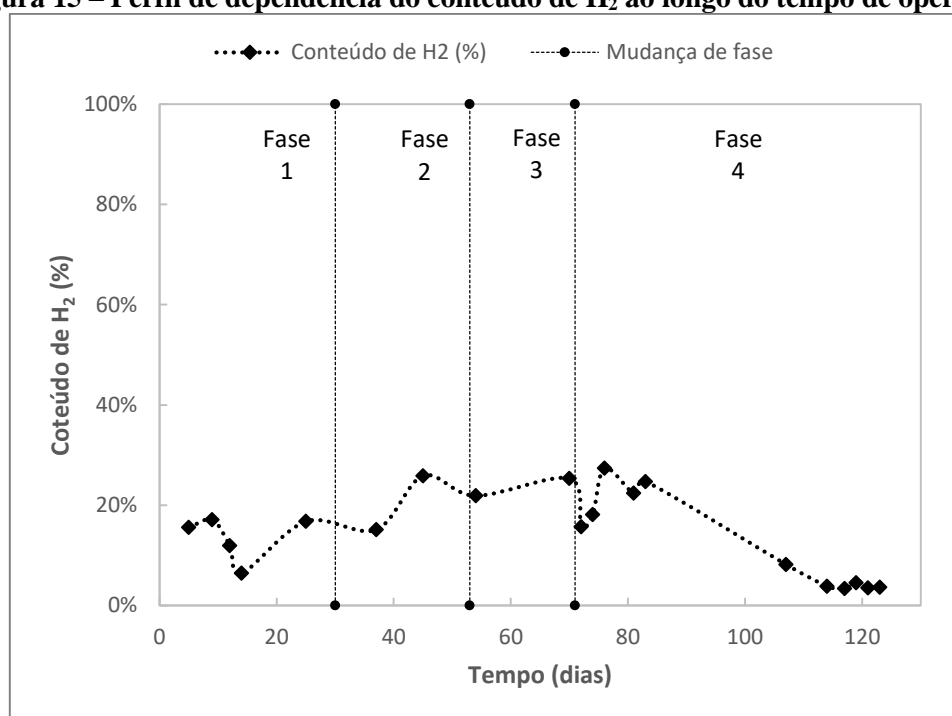
O biogás produzido durante a operação do reator foi avaliado quanto a produção de hidrogênio, dióxido de carbono e metano. O gás metano não foi detectado em nenhuma das fases operacionais, comprovando a eficiência do tratamento térmico do lodo utilizado para inocular o reator. Os resultados obtidos podem ser vistos nas Figuras 15 e 16 e na Tabela 18.

Houve produção apenas de H₂ e CO₂, que não apresentaram variações significativas em relação à composição percentual do biogás. Nota-se que as fases com menores produções volumétricas e rendimentos de hidrogênio (fases 2 e 3) foram as que obtiveram as maiores

porcentagens de hidrogênio no biogás produzido – 20,48 e 23,61%. Em valores médios, a composição de hidrogênio foi praticamente igual na fase com menos glicerol (fase 1) e na fase em que este foi eliminado do afluente (fase 4) – 13,55 e 12,31%. Em todas as fases operacionais, o biogás foi representado por quantidades elevadas de CO₂, entre 76,39 e 87,69 %.

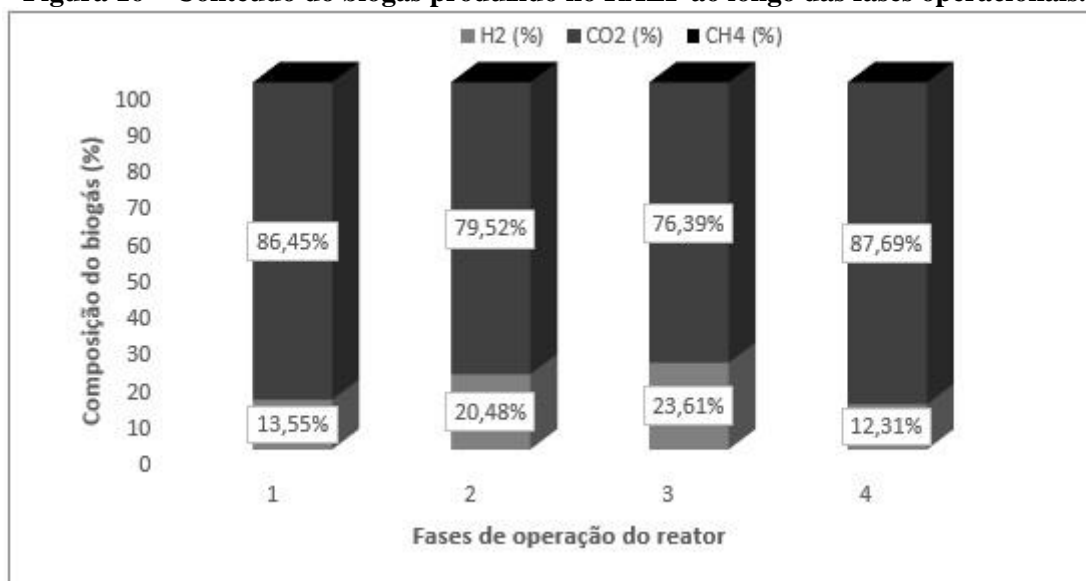
Os valores de maior conteúdo de gás hidrogênio no biogás nas fases com menores HY e HPR representam também as fases com menos dados experimentais disponíveis devido a problemas técnicos, o que não permite uma análise mais aprofundada do biogás.

Figura 15 – Perfil de dependência do conteúdo de H₂ ao longo do tempo de operação.



Fonte: Autora (2019).

Figura 16 – Conteúdo do biogás produzido no RALF ao longo das fases operacionais.



Fonte: Autora (2019).

Tabela 18 – Valores médios e desvios padrões da composição percentual do biogás produzido no RALF em cada fase operacional.

Fase	M/GB	N amostral	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
1	4/1	5	13,55 ± 4,48	86,45 ± 4,48	00,00 ± 0,00
2	4/2	2	20,48 ± 7,57	79,52 ± 7,57	00,00 ± 0,00
3	4/3	2	23,61 ± 2,45	76,39 ± 2,45	00,00 ± 0,00
4	4/0	11	12,31 ± 9,55	87,69 ± 11,70	00,00 ± 0,00

M/GB = Concentração de melão/glicerol bruto em g.L⁻¹. Fonte: Autora (2019).

5.7 Composição dos metabólitos solúveis no efluente

Aqui estão apresentados os compostos intermediários de valor agregado que foram produzidos durante a acidogênese dos açúcares – glicose do melão e o próprio glicerol do glicerol bruto – junto com o hidrogênio, em diferentes concentrações. Na Tabela 19 estão as concentrações médias desses metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada fase operacional. Todas as fases tiveram produção dos álcoois 1,3-propanodiol e etanol e dos ácidos acético, propiônico, butírico, isovalérico, valérico e capríco. Nota-se que os metabólitos mais produzidos foram 1,3-propanodiol e os ácidos acético e propiônico.

O metanol, embora tenha sido a matéria prima do glicerol bruto produzido para a alimentação do reator, não foi detectado nas amostras experimentais. Paranhos (2016) e Simões (2017), que trabalharam com glicerol como substrato em reatores RALF para produzir hidrogênio e metabólitos solúveis, identificaram o metanol em concentrações de 38,50 a 81,64

mg.L⁻¹ e $68,10 \pm 3,10$ a $156,60 \pm 5,60$ mg.L⁻¹, respectivamente. Como o limite de detecção do metanol disponível na metodologia utilizada neste trabalho era de 500 mg.L⁻¹, não deve ter sido capaz de quantificá-lo.

Visto que cada um dos componentes produzidos possui uma massa molecular distinta, para ver a predominância de cada um em relação ao total de produtos líquidos, estão mostradas na Tabela 20 e na Figura 17 as concentrações molares médias dos álcoois e ácidos produzidos no reator em cada fase de operação e a porcentagem molar de cada um em relação aos metabólitos solúveis totais produzidos. Além disso, a distribuição percentual dos metabólitos ao longo das fases pode ser vista na Figura 18.

Como dito nos tópicos anteriores, sobre a queda da produção de hidrogênio nas fases com maior proporção de glicerol afluyente ao reator – com destaque para a fase 3 – pode-se ver aqui que esta fase apresentou um acúmulo de ácidos voláteis no efluente, contendo a maior concentração média de ácido acético e a segunda de isovalérico, além das maiores concentrações de ácido propiônico, butírico, valérico e capróico.

Tabela 19 – Concentrações médias dos metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada fase operacional.

Metabólito	Valor médio do metabólito (mg.L ⁻¹)			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
N amostral	6	3	5	6
1,3-propanodiol	57,46	660,05	992,30	202,65
Etanol	202,80	36,70	48,94	60,52
Metanol ¹	ND	ND	ND	ND
Ácido acético	77,28	385,90	481,11	456,52
Ácido propiônico	49,56	884,56	577,44	368,25
Ácido isobutírico	7,77	ND	ND	12,99
Ácido butírico	21,44	110,90	152,58	128,05
Ácido isovalérico	25,05	16,05	36,72	48,96
Ácido valérico	5,67	154,86	156,06	65,06
Ácido capróico	22,13	60,85	103,11	42,82

¹Limite de detecção do metanol = 500 mg.L⁻¹. Fonte: Autora (2019).

A presença de grande concentração de ácido acético na quarta fase, representando 26,89% dos SMPs está relacionada ao maior rendimento de hidrogênio HY, alcançado nesta fase ($3,77 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$), pois a rota metabólica do ácido acético produz hidrogênio. O etanol teve uma concentração molar representativa de 30,83% dos SMPs durante a primeira

fase operacional, tendo diminuído de maneira drástica nas fases seguintes, com o aumento da proporção do glicerol (0,97 e 1,16% nas segunda e terceira fases, respectivamente), tendo se recuperado apenas para 2,73% ao eliminar o glicerol na quarta fase de operação.

De acordo com Lopes et al. (2017), o glicerol favorece a produção de ácido propiônico (HPr), em seu trabalho ele atingiu rendimentos de HPr entre 11,90 e 69,30%. Esta afirmação corrobora os resultados obtidos neste trabalho, visto que as fases 2 e 3, as duas com mais proporção de glicerol na alimentação do reator, obtiveram rendimentos de 37,46 e 21,99% de HPr, respectivamente.

A fase 3, que teve o menor rendimento de HY ($0,020 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$), teve o maior rendimento de 1,3-propanodiol (38,81%) e um grande rendimento de ácido propiônico (21,99%). Aumentar a concentração de glicerol leva a aumentar as concentrações de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e a diminuir a produção de H_2 (VIANA et al., 2014), e Lopes et al. (2017) associaram a produção de 1,3-PDO e HPr, consumidores de hidrogênio, como a principal causa para a diminuição do HY em seu trabalho. Estas justificativas encontradas pelos autores podem se aplicar aos resultados encontrados aqui.

Tabela 20 – Concentração molar e porcentagem dos metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada fase operacional.

Metabólito	Valor médio do metabólito (mmol/L) e porcentagem em relação ao total de metabólitos totais produzidos por fase							
	Fase 1		Fase 2		Fase 3		Fase 4	
	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%
N amostral	6		3		5		6	
1,3-propanodiol	4,37	14,43%	50,22	28,71%	75,50	38,81%	15,42	15,12%
Etanol	9,34	30,83%	1,69	0,97%	2,25	1,16%	2,79	2,73%
Ácido acético	4,64	15,31%	23,17	13,25%	28,89	14,85%	27,41	26,89%
Ácido propiônico	3,67	12,11%	65,53	37,46%	42,78	21,99%	27,28	26,76%
Ácido isobutírico	0,68	2,26%	ND	ND	ND	ND	1,14	1,12%
Ácido butírico	1,89	6,23%	9,77	5,59%	13,44	6,91%	11,28	11,07%
Ácido isovalérico	2,56	8,44%	1,64	0,94%	3,75	1,93%	5,00	4,91%
Ácido valérico	0,58	1,91%	15,82	9,04%	15,94	8,19%	6,64	6,52%
Ácido capróico	2,57	8,48%	7,07	4,04%	11,98	6,16%	4,97	4,88%
AVT	16,59	54,75%	123,00	70,32%	116,78	60,03%	83,74	82,14%
SMP	30,31	100,00%	174,91	100,00%	194,54	100,00%	101,95	100,00%

AVT = ácidos voláteis totais produzidos; SMP = metabólitos solúveis totais produzidos.
Porcentagens calculadas a partir das concentrações molares. Fonte: Autora (2019).

Figura 17 – Perfil de dependência da concentração molar média dos metabólitos solúveis produzidos no RALF ao longo do tempo operacional.

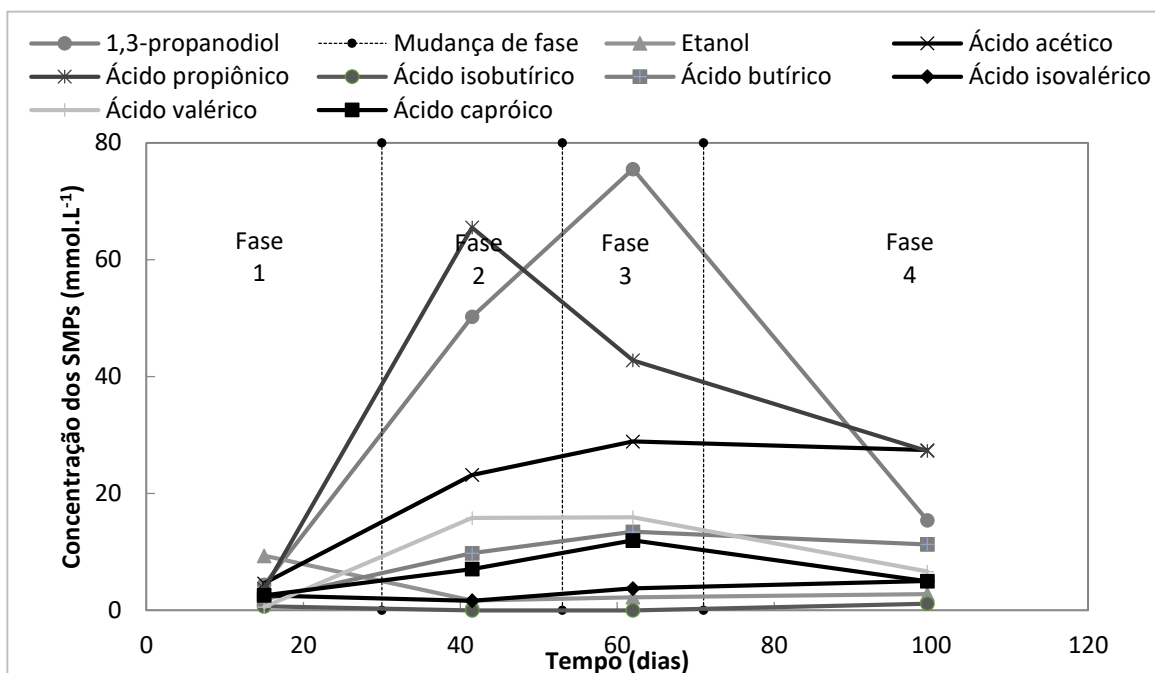
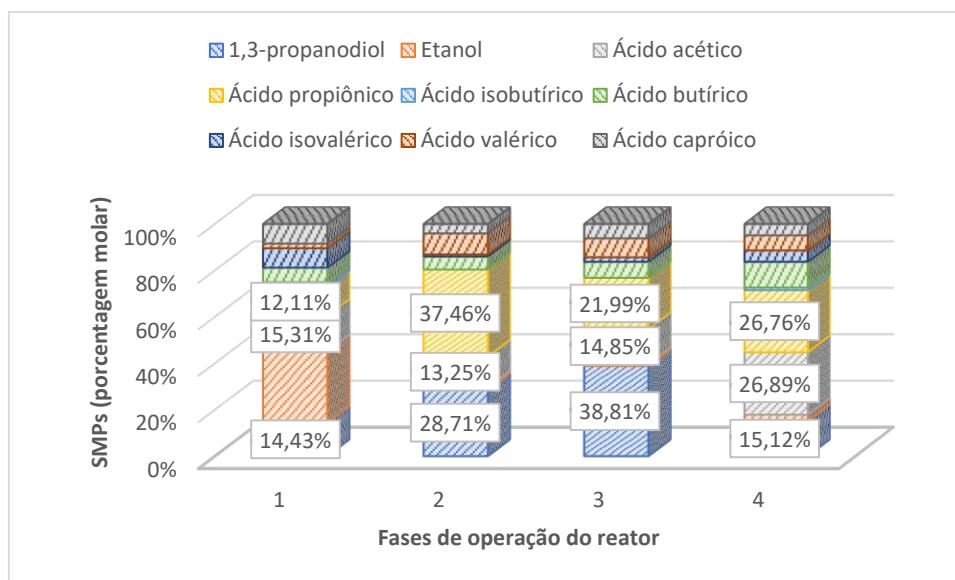


Figura 18 – Metabólitos solúveis produzidos no RALF ao longo das fases operacionais.



6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados e discutidos, pode-se concluir que a utilização de um reator anaeróbio de leito fluidificado para produzir hidrogênio através da cofermentação de melão e glicerol bruto precisa levar em consideração que, embora o melão isoladamente tenha grande potencial para produzir H_2 , sua mistura com glicerol bruto influencia a fermentação para rotas metabólicas consumidoras de H_2 , mas que geram produtos intermediários de valor agregado, como o 1,3-propanodiol e o ácido propiônico.

Os resultados encontrados indicam que o glicerol bruto afetou significativamente a produção de hidrogênio no reator e que, de acordo com os valores de HY e HPR, a melhor proporção para misturar os substratos melão e glicerol bruto é 4/1.

O tratamento térmico do lodo para inoculação do reator se mostrou eficiente. Como não houve produção de gás metano em nenhuma das fases operacionais e o conteúdo de hidrogênio no biogás foi relativamente baixo e estável (valores médios máximo de 23,61 e mínimo de 12,31%), o objetivo do tratamento de inibir a produção de bactérias metanogênicas foi bem-sucedido.

O aumento da proporção de glicerol ao longo das fases operacionais influenciou negativamente a produção de hidrogênio. E a remoção completa do glicerol da alimentação do reator levou ao melhor resultado – $3,77 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ na quarta fase. A produção volumétrica seguiu a mesma tendência, diminuiu de 0,32 para $0,17 \text{ L}_{H_2} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ entre a primeira e terceira fases operacionais, e teve uma elevação para $0,34 \text{ L}_{H_2} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ na quarta.

Os principais metabólitos produzidos foram o 1,3-propanodiol e os ácidos acético e propiônico, todos com rotas fermentativas consumidoras de hidrogênio. A terceira fase de operação, que apresentou o menor HY, teve o maior rendimento molar de 1,3-propanodiol, 38,81% e grandes rendimentos de ácidos propiônico (21,99%) e acético (14,85%).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção de hidrogênio através de diferentes proporções de melaço e glicerol bruto em ensaios em batelada;
- Estudar a produção de hidrogênio com o glicerol bruto;
- Reaproveitar o etanol gerado como metabólito para produzir biodiesel;
- A partir dos melhores resultados dos ensaios obtidos nos ensaios em batelada, aplicar essas proporções em reator de operação contínua, como o RALF;
- Avaliar a influência do TDH na produção biológica de hidrogênio variando este ao longo da operação do reator;
- Estudar a produção biológica de hidrogênio em RALF com melaço e glicerol como substratos em diferentes configurações de reatores;
- Estudar a produção biológica de hidrogênio em RALF com melaço e glicerol como substratos utilizando diferentes materiais suportes;
- Estudar a produção biológica de hidrogênio em RALF com melaço e glicerol como substratos utilizando diferentes fontes de inóculo.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC/EMBRAPA.** Árvore do conhecimento cana- de- açúcar. **Disponível em:** <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>>. **Acesso em: 27 fev. 2018.**
- AHN, E. et al.** A Low-Waste Process for the Production of Biodiesel. *Separation Science and Technology*, v. 30, n. 7–9, p. 2021–2033, 1995. **Disponível em:** <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01496399508010391>>.
- ALBANEZ, R.** Codigestão de vinhaça e melaço em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio. **2015. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.**
- ALBANEZ, R. et al.** Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 45, p. 20473–20484, 2016.
- AMORIM, E. L. C. de.** Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado. **2009. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.**
- AMORIM, N. C. dos S.** Produção de hidrogênio a partir da manipueira em reator anaeróbio de leito fluidificado. **2012. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.**
- ANDRADE, G. V. N. de.** Projeto de estrutura de controle para uma planta de produção de etanol. **2008. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.**
- APHA.** Standard Methods For Examination Of Water And Wastewater. **22. ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, 1998.**
- ASTM.** ASTM D7777-13, Standard Test Method for Density, Relative Density, or API Gravity of Liquid Petroleum by Portable Digital Density Meter. **West Conshohocken, PA. ASTM International, , 2013. . Disponível em: <www.astm.org>.**
- ASTM.** ASTM D5555-95(2017), Standard Test Method for Determination of Free Fatty Acids Contained in Animal, Marine, and Vegetable Fats and Oils Used in Fat Liquors and Stuffing Compounds. **West Conshohocken, PA. ASTM International, , 2017. . Disponível em: <www.astm.org>.**
- ATHALYE, S. K.; GARCIA, R. A.; WEN, Z.** Use of biodiesel-derived crude glycerol for

producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *pythium irregulare*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 7, p. 2739–2744, 2009.

BARCA, C. et al. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater : A review. *Bioresource Technology*, v. 185, p. 386–398, 2015.

BARROS, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. 2009. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BARROS, A. R. Produção de hidrogênio e etanol em reator anaeróbio de leito fluidizado: avaliação do desempenho de três materiais suporte em diferentes condições operacionais. 2012. Universidade de São Carlos, São Carlos, 2012.

BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 92 immobilized in *Luffa cylindrica* L. sponge discs and ca-alginate matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1499–1507, 2012.

BERNAL, M. et al. Evaluating Colombian *Clostridium* spp. strains' hydrogen production using glycerol as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 6, 2013.

BHARATHIRAJA, B. et al. Biohydrogen and biogas – an overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel*, v. 185, n. 810–828, 2016.

BIEBL, H. et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 52, n. 3, p. 289–297, set. 1999.

BOSIO, M. Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbio de leito fluidizado e em reator de leito granular expandido a partir de glicerol. 2014. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. Disponível em:

<file:///C:/Users/livia/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Bosio - 2014 - Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbio de leito fluidizado e em reator de leito granular expandido a pa.pdf>.

BRAVO, I. S. M. et al. Biohydrogen Production in an AnSBBR Treating Glycerin-Based Wastewater: Effects of Organic Loading, Influent Concentration, and Cycle Time. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, n. 4, p. 1892–1914, 2014.

BUSATO, R. Desempenho de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente como tratamento de efluente de reator UASB: estudo de caso da ETE de Imbituva. **2004. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.**

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnology and Bioengineering*, v. **107**, n. **1**, p. **76–84**, **2010**.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. **95**, n. **1**, p. **13–27**, **2012**.

CHAVES, T. C. Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leito fluidificado. **2018. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.**

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

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella* sp. TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. **39**, n. **18**, p. **9580–9587**, **2014**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.083>>.

DE SÁ, L. R. V. et al. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. **38**, n. **7**, p. **2986–2997**, **2013**.

DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. **1987. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1987.**

DOS REIS, C. M. et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. **40**, n. **27**, p. **8498–8509**, **20 jul. 2015**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319915010745?via%3Dihub>>. Acesso em: **22 fev. 2018**.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related

substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017>>.

ELSHARNOUBY, O. et al. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 12, p. 4945–4966, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>>.

ETHIER, S. et al. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 88–93, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.021>>.

FAPESP. Resíduos bem-vindos – Subproduto do biodiesel pode ser usado para suprimir poeira de vagões de minério. *REVISTA FAPESP*, p. 58–63, 2012.

FERREIRA, J. dos S. Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas. *Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas*. Janaína dos Santos Fe. 2014. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

FUENTES, M. et al. Global modeling and simulation of a three-phase fluidized bed bioreactor. *Computers and Chemical Engineering*, v. 33, n. 1, p. 359–370, 2009.

HARADA, P. K. Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando glicerol e melão de cana como fontes de carbono. 2012. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ITO, T. et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, n. 3, p. 260–265, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172305704631>>.

JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 18, n. 2, p. 121–132, 1 maio 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X03001980?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

JORGE, N. et al. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em

frituras. *Quimica Nova*, v. 28, n. 6, p. 947–951, 2005.

JÚNIOR, A. D. N. F. Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo. 2013. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

KARADAG, D. et al. A review on fermentative hydrogen production from dairy industry wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 89, n. 11, p. 1627–1636, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4490>>.

KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. 1,3-Propanediol production and tolerance of a halophilic fermentative bacterium, *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. *Journal of Biotechnology*, v. 158, n. 4, p. 242–247, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.013>>.

KNOTHE, G. et al. *Manual de Biodiesel*. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2006.

LAMAISON, F. do C. et al. Pré-tratamento de lodo anaeróbio para o aumento da produção de bio-hidrogênio pela água residuária de processamento da mandioca. *Acta Scientiarum - Technology*, v. 36, n. 3, p. 437–444, 2014.

LEE, J. Y. et al. Two-stage biogas production by co-digesting molasses wastewater and sewage sludge. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 37, n. 12, p. 2401–2413, 2014.

LEE, J. Y.; WEE, D.; CHO, K. S. Effects of volatile solid concentration and mixing ratio on hydrogen production by co-digesting molasses wastewater and sewage sludge. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 1542–1550, 2014.

LEITE, J. A. C. et al. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 579–586, 2008.

LEME, E. J. de A. *Manual Prático de Tratamento de Águas Residuárias*. v. 1 ed. São Carlos: EduFSCar, 2010.

LIANG, Y. et al. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 17, p. 6745–6750, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.087>>.

LIU, Y.; KOH, C. M. J.; JI, L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago*

maydis. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 4, p. 3927–3933, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.115>>.

LO, Y. C. et al. **Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria.** *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 35, p. 15815–15822, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.083>>.

LOPES, H. J. S. **Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura para produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos.** 2015. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015. Disponível em: <[file:///C:/Users/livia/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Lopes - 2015 - Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura para produção de.pdf](file:///C:/Users/livia/AppData/Local/Mendeley%20Ltd./Mendeley%20Desktop/Downloaded/Lopes%20-%202015%20-%20Valora%C3%A7%C3%A3o%20de%20res%C3%ADuos%20e%20subprodutos%20agroindustriais%20utilizando%20reatores%20anaer%C3%B3bios%20em%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20escura%20para%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de.pdf)>.

LOPES, H. J. S.; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. **Co-Fermentation of Cheese Whey and Crude Glycerol in EGSB Reactor as a Strategy to Enhance Continuous Hydrogen and Propionic Acid Production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 183, n. 3, p. 712–728, 2017.

LOVATEL, E. R. **Produção de hidrogênio através da digestão anaeróbia de glicerol e vinhoto utilizando consórcio microbiano.** 2016. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

LOVATO, G. et al. **The effect of organic load and feed strategy on biohydrogen production in an AnSBBR treating glycerin-based wastewater.** *Journal of Environmental Management*, v. 154, p. 128–137, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.014>>.

LOVATO, G. et al. **Design study of an AnSBBR for hydrogen production by co-digestion of whey with glycerin: Interaction effects of organic load, cycle time and feed strategy.** *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 15, p. 9567–9576, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.125>>.

MAINTINGUER, S. I. et al. **Fermentative hydrogen production by microbial consortium.** *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 16, p. 4309–4317, ago. 2008.

MARÇON, R. O. Pré-tratamento da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais e gordura animal. **2010. Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2010.**

MARQUES, P. A. S. S. et al. Bio-hydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*. Livro de procedings do Congresso HYPOTHESIS VIII, n. April 2009, p. 1–5, 2009.

MARTINS, J. S.; AMORIM, E. L. C. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio a partir de efluente do processamento de coco. *Ciência & Engenharia*, v. 25, n. 1, p. 17–26, 2016.

MARU, B. T. et al. Glycerol fermentation to hydrogen by *Thermotoga maritima*: Proposed pathway and bioenergetic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 14, p. 5563–5572, 2013.

MENZEL, K.; ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, n. 2, p. 82–86, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022996000877>>.

MIZUNO, O. et al. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, v. 73, p. 59–65, 2000.

MOSEY, F. E. Mathematical modeling of the anaerobic process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Sci. Tech*, v. 15, p. 209–232, 1983.

MOTA, C. J. a.; SILVA, C. X. a. Da; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

MOTA, V. T. et al. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Research*, v. 128, p. 350–361, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>>.

NAZARETH, T. C. Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado. **2015.**

Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

NGO, T. A.; KIM, M. S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, n. 10, p. 5836–5842, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.057>>.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, n. 40, p. 17884–17895, 2016.

OHIMAIN, E. I.; IZAH, S. C. A review of biogas production from palm oil mill effluents using different configurations of bioreactors. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 70, p. 242–253, 2017.

PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. Glycerol: properties and production. In: CHEMISTRY, T. R. S. OF (Ed.). The future of glycerol. 2nd. ed. UK: RCS, 2010. p. pp 1-28.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. Lipid Technology, v. 21, n. 4, p. 83–87, 2009.

PARANHOS, A. G. de O. Produção otimizada de 1, 3-propanodiol, ácido glicerol bruto e cultura mista, em reator propiônico, etanol e hidrogênio, a partir de glicerol bruto e cultura mista, em reator anaeróbico de leito fluidificado. 2016. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

PARK, M. J. et al. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. Renewable Energy, v. 35, n. 12, p. 6194–6202, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.135>>.

PAWAR, S. S.; VAN NIEL, E. W. J. Thermophilic biohydrogen production: How far are we? Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 18, p. 7999–8009, 2013.

PEIXOTO, G. Produção De Hidrogênio Em Reator Anaeróbico De Leito Fixo E Fluxo Ascendente a Partir De Água Residuária De Indústria De Refrigerantes. 2008. Universidade

de São Paulo, São Carlos, 2008.

PEIXOTO, G. Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais. **2011. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.**

PIACENTE, F. J. Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. **2005. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.**

PIRES, A. Chance ao biocombustível - Brasil deve contar com participação maior dos renováveis. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/opiniao/chance-ao-biocombustivel-21383642>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

POTT, R. W. M.; HOWE, C. J.; DENNIS, J. S. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by *Rhodopseudomonas palustris* to produce hydrogen. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 464–470, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.094>>.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: Effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 11, p. 3933–3939, 2008.

RAFRAFI, Y. et al. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 12, p. 4975–4985, 22 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319913003741?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

RAHMAN, S. N. A. et al. Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 66, p. 137–162, 2016.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L.; LUIS, R. W. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 43, n. 29, p. 13081–13089, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.070>>.

REGO, G. C. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado mesofílico a partir de diferentes substratos orgânicos da indústria sucroalcooleira. **2016. Universidade**

de São Paulo, São Carlos, 2016.

REIS, C. M. dos. Efeito da velocidade ascensional na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. 2010. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 17, p. 6970–6979, 2013.

RIVALDI, J. D. et al. Glicerol de biodiesel: Estratégias Biotecnológicas para o Aproveitamento do Glicerol Gerado da Produção de Biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 37, p. 44–51, 2007.

SANTOS, J. K. P. dos. Produção de hidrogênio a partir da glicerina em reator anaeróbio em batelada. 2017. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

SANTOS, S. C. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico. 2014. Universidade de São Carlos, São Carlos, 2014.

SARMA, S. J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.050>>.

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

SEARMSIRIMONGKOL, P. et al. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 20, p. 12810–12821, 1 out. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031991101740X?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

SELEMBO, P. A. et al. High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 13, p. 5373–5381, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.002>>.

- SILVA, A. N.** Produção de hidrogênio a partir de efluentes laticínios. **2015. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.**
- SILVA, C. E. V.** Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar. **2008. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.**
- SILVA, A. J. V. R. DA.** Determinação da cinética da reação de produção de biodiesel de óleo de fritura para projeto preliminar de reator tubular. **2018. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.**
- SIMÕES, A. N.** Processamento do glicerol bruto em reatores anaeróbios de leito fluidificado, acidogênico e metanogênico, em temperatura mesofílica. **2017. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.**
- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A.** 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*, p. 1–12, **2017.**
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.149>>.
- TANG, S. et al.** *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, n. 2, p. 157–162, **2009.**
- TAPIA-VENEGAS, E. et al.** Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 19, p. 8295–8308, **2015.**
- TEMUDO, M. F. et al.** Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, n. 6, p. 1088–1098, **2008.**
- TOLVANEN, K. E. S.; KARP, M. T.** Molecular methods for characterizing mixed microbial communities in hydrogen-fermenting systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 9, p. 5280–5288, 1 maio 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319911000395?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 fev. 2018.
- TUNÇAY, E. G. et al.** Dark fermentative hydrogen production from sucrose and molasses. *International Journal of Energy Research*, n. 41, p. 1891–1902, **2017.**
- UNIC RIO.** Agenda 2030. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

URBANIEC, K.; BAKKER, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 9, p. 3648–3658, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.073>>.

VARRONE, C. et al. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 21, p. 16479–16488, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.106>>.

VASCONCELOS, E. A. F.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. *Bioenergy Research*, 2016.

VIANA, M. B. Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel. 2011. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VIANA, Q. M. et al. Fermentative H₂ production from residual glycerol: a review. *Biotechnology Letters*, v. 36, n. 7, p. 1381–1390, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10529-014-1507-4>>.

WANG, B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 11, p. 4361–4367, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.120>>.

WU, X.; ZHU, J.; MILLER, C. Kinetics study of fermentative hydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose under controlled pH. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 48, p. 477–485, 2013.

XIA, Y. et al. Effects of substrate loading and co-substrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 18, p. 13652–13659, 1 set. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319912004430?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, p. 13, 2012. Disponível em: <<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-13>>.

ZHANG, Z.-P. et al. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, n. 2, p. 185–191, 1 fev. 2007. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319906003259?via%3Dihub>>.

Acesso em: 17 fev. 2018.

ZHU, J. et al. Swine manure fermentation for hydrogen production. Bioresource Technology, v. 100, n. 22, p. 5472–5477, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.045>>.