



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



FABRÍCIO SANTOS DA SILVA BORGES

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DO GLICEROL BRUTO NA PROSPECÇÃO DE
BIOPRODUTOS UTILIZANDO RESÍDUO DE SUINOCULTURA COMO INÓCULO.**

Maceió

2024

FABRÍCIO SANTOS DA SILVA BORGES

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DO GLICEROL BRUTO NA PROSPECÇÃO DE
BIOPRODUTOS UTILIZANDO RESÍDUO DE SUINOCULTURA COMO INÓCULO.**

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 (a): Profa. Dra. Dayana de Gusmão Coêlho

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim

Maceió

2024

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

B732e Borges, Fabrício Santos da Silva.

Estudo da potencialidade do glicerol bruto na prospecção de bioprodutos utilizando resíduo de suinocultura como inóculo / Fabrício Santos da Silva Borges. – 2024.
90 f. : il. color.

Orientadora: Dayana de Gusmão Coêlho.

Co-orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 68-90.

1. Digestão anaeróbia. 2. Hidrogênio, Produção de. 3. Ácidos orgânicos, Produção de. 4. Suinocultura - Efluentes. 5. Liofilização. I. Título.

CDU: 664.8.047



Folha de Aprovação

FABRÍCIO SANTOS DA SILVA BORGES

ESTUDO DA POTENCIALIDADE DO USO DE RESÍDUO DE SUINOCULTURA E DA GLICERINA NA PROSPECÇÃO DE BIOPRODUTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.
Em: 09 /09 /2024

Profa. Dra. Dayana de Gusmão Coêlho
(Orientadora - PPGRHS/ CTEC/UFAL)

Banca examinadora:

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

Profa. Dra. Karina Ribeiro Salomon
(Examinadora Interna – PPGRHS/ CTEC/UFAL)

Profa. Dra. Georgia Nayane Silva Belo Gois
(Examinadora Externa à Instituição - IFAL)

A meus queridos pais, José da Silva Borges e Quitéria Maria dos Santos,

pelo exemplo que são.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho;

A meus amados pais, José da Silva Borges e Quitéria Maria dos Santos pelo amor, criação e zelo, pois se cheguei até aqui foi graças a eles;

A minha esposa Daniele por todo amor e carinho e compreensão;

A meus filhos Letícia e Pedro por quem labuto todos os dias;

A meus tios Claudenice e José Júlio por todo incentivo e ajuda;

A todos os meus familiares, em especial, aos meus avôs Afra e Olavo, pelo carinhoso apoio e zelo;

À Profa. Dra. Dayana de Gusmão Coelho, mais que orientadora, amiga, pela confiança, incentivo e constante exemplo de profissionalismo e pelos valiosos ensinamentos;

O meu muito obrigado à Lucena; o meu coorientador Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, pela oportunidade, confiança, incentivo e dedicada orientação;

Às pesquisadoras Georgia Gois e Taciana Chaves pela amizade, carinho, imenso apoio e por todo o auxílio na parte de Cromatografia;

Ao pessoal dos laboratórios LSA, LASSOP e EMA pelo apoio e trabalho em equipe;

Por fim todos aqueles que de alguma forma direta ou indireta teve uma contribuição em meu trabalho, mas que não foram citados.

RESUMO

Subproduto da produção de biodiesel, o glicerol bruto é uma fonte de carbono promissora para aplicação na digestão anaeróbia, com produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis (AOVs), além de outros bioprodutos de valor agregado. Neste sentido, avaliou-se o potencial de bioconversão do glicerol bruto, em reatores de batelada sob condições mesofílicas utilizando efluente de suinocultura como inóculo. O estudo foi dividido em duas fases. A primeira fase buscou-se avaliar as melhores condições do inóculo, realizando quatro variações: in natura, auto fermentado, nitrogenado e liofilizado, tendo como parâmetro o inóculo que obteve melhor produção de H_2 , pois a produção de ácidos orgânicos é acompanhada pela produção do biogás. Na segunda etapa foi realizada o acompanhamento da evolução dos metabólicos solúveis totais produzidos, a cada 2 dias, no período total de 20 dias, utilizando o inóculo que teve melhor produção de hidrogênio. A produção mais elevada de H_2 foi verificada utilizando-se o inóculo liofilizado ($93,068 \pm 11,13$ mL de H_2 acumulado). Sendo assim, o ensaio com o inóculo liofilizado, na segunda etapa, produziu como principais produtos etanol, ácido butírico e ácido acético nas concentrações de ($468,22 \text{ mmol/L} \pm 6,83$), ($306,77 \text{ mmol/L} \pm 11,92$) e ($217,84 \text{ mmol/L} \pm 14,96$), respectivamente, com redução de DQO em 55% e de sólidos voláteis em 29%, indicando que o consórcio de microrganismos presentes no ensaio direcionou entre as rotas etanoica, do butirato e do acetato. Sendo assim, observou-se que digestão anaeróbia do glicerol bruto pode ser uma alternativa para o seu tratamento com consequente gerações dos bioprodutos como H_2 , biocombustíveis e ácidos orgânicos de maior valor agregado, principalmente ácido butírico.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia. Produção de hidrogênio. Produção de ácidos orgânicos. Efluente de suinocultura. Liofilização.

ABSTRACT

A by-product of biodiesel production, crude glycerol is a promising carbon source for application in anaerobic digestion, with biological production of hydrogen and volatile organic acids (VOCs), as well as other value-added bioproducts. To this end, the potential for bioconversion of crude glycerol, in batch reactors under mesophilic conditions using pig farm effluent as inoculum. The study was divided into two phases. The first phase sought to evaluate the best inoculum conditions, four variations: in natura, self-fermented, nitrogenized and freeze-dried. lyophilized, using as a parameter the inoculum that produced the best H_2 , because the production of organic acids is accompanied by the production of biogas. second stage was to monitor the evolution of the total soluble metabolic produced, every 2 days, for a total period of 20 days, using the inoculum with the best hydrogen production. The highest H_2 production was seen using the freeze-dried inoculum (93.068 ± 11.13 mL of accumulated H_2). Thus, the test with the freeze-dried inoculum in the second stage produced ethanol, butyric acid and acetic acid at concentrations of (468.22 mmol/L ± 6.83), (306.77 mmol/L ± 11.92) and ($217, 84$ mmol/L ± 14.96), respectively, with a 55% reduction in COD and a 29% reduction in volatile solids, indicating that the consortium of microorganisms present in the test was directed between the ethanoic, butyrate and acetate routes. Thus, it was observed that anaerobic digestion of crude glycerol can be an alternative for its treatment with consequent generation of bioproducts such as H_2 , biofuels and organic acids with higher added value, especially butyric acid.

Keywords: Anaerobic digestion. Hydrogen production. Production of organic acids. Pig farm effluent. freeze-drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.....	21
Figura 2 - Estrutura do glicerol.....	22
Figura 3 - Rota fermentativa do glicerol.....	25
Figura 4 - Etapas da fermentação anaeróbia.....	32
Figura 5 - Caminho metabólico dentro das bactérias formadoras de ácidos orgânicos.....	34
Figura 6 - Fluxograma das etapas do estudo realizado.....	43
Figura 7 - Representação esquemática do processo de produção de biodiesel.....	44
Figura 8 - Reator STR para produção do glicerol bruto.	45
Figura 9 - Separação do biodiesel e glicerol bruto	45
Figura 10 - Glicerol bruto produzido do processo de transesterificação de óleo de fritura de soja.....	46
Figura 11: Efluente de suinocultura: Inóculo	47
Figura 12 - Estudo da avaliação do inóculo. Esquema dos testes preliminares.	47
Figura 13 - Variações do inóculo de efluente de suinocultura: R1 (in natura); R2 (auto fermentado); R3 (nitrogenado); R4 (liofilizado).	48
Figura 14 - Ilustração do reator em batelada para averiguação do melhor inóculo.....	49
Figura 15 - Ilustração do reator em batelada para obtenção dos bioprodutos.	51
Figura 16 - Produção de hidrogênio acumulado das quatro variações do inóculo.	57
Figura 17 - Concentração de metabólicos solúveis (mmol/L).....	59
Figura 18 - Produção de hidrogênio acumulado do inóculo liofilizado.	62

Figura 19 - Concentração de metabólicos solúveis (mmol/L)..... 65

Figura 20 - Porcentagem de dominância acumulada dos metabólicos solúveis. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos da fermentação anaeróbia do glicerol para produção de bioprodutos.	20
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C.	23
Tabela 3 - Estudo da temperatura na produção de H ₂ fermentativo.	35
Tabela 4 - Descrição das variações do inóculo.	48
Tabela 5 - Monitoramento do reator em batelada para averiguação do inóculo.	50
Tabela 6 - Monitoramento do reator em batelada para obtenção de bioprodutos.	51
Tabela 7 - Características físico química do substrato e do inóculo.	54
Tabela 8 - Características iniciais e finais e eficiências de remoção nos reatores estudados da Etapa 1.	55
Tabela 9 - Concentrações em mmol/L dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores (etapa1).	59
Tabela 10 - Características iniciais e finais e eficiências de remoção no reator contendo o inóculo liofilizado.	61
Tabela 11 - Concentrações em mmol/L dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores (etapa2).	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA	Métodos Padrões para Análise de Águas e efluentes
AOVs	Ácidos Orgânicos Voláteis
CNPE	conselho nacional de política energética
COV	Carga orgânica volumétrica
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor mode
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FID	Detector de ionização de chama
GEE	Gases de efeito estufa
LASSOP	Laboratório de sistemas de separação e otimização de processos
Lafa	Laboratório de análises farmacêuticas e alimentícias
LOG	logaritmo
LN	logaritmo natural
MST	Metabólicos solúveis totais
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OECD	The organisation for economic Co -operation and development
pH	Potencial Hidrogênio
RALF	Reator Anaeróbio de Lodo Fluidizado
RPM	Rotação por minuto
SVT	Sólidos voláteis totais
SF	Sólidos fixos
ST	Sólidos voláteis
TCD	Detector de condutividade térmica
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica

TOA	Ácidos orgânicos totais
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VOCs	Volatile organic acids

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Glicerol, fonte orgânica, para produção de bioprodutos	20
3.1.1 Glicerol bruto.....	21
3.2 Bioprodutos gerados na digestão anaeróbia do glicerol.....	24
3.3 Efluente de suinocultura	26
3.4 Inóculo: Características e fontes para digestão anaeróbia	28
3.5 Pré-tratamento de culturas mistas para a geração de H ₂	29
3.6 Aspectos gerais do processo de fermentação anaeróbia.....	31
3.6.1 Acidogênese	32
3.7 Fatores que influenciam o processo fermentativo anaeróbia	34
3.7.1 Temperatura	35
3.7.2 pH.....	36
3.7.3 Pressão parcial de hidrogênio.....	37
3.7.4 Substrato.....	37

3.7.5 Grau de agitação	38
3.7.6 Inóculo	39
3.7.7 Modo operacional do reator	40
3.8 Estratégias para a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.....	40
3.9 Reatores anaeróbios em batelada.....	41
4 METODOLOGIA	43
4.1 Substrato: Produção de glicerol bruto.....	44
4.2 Inóculo e pré-tratamento	46
4.3 Ensaio em reatores anaeróbios em batelada: Escolha do inóculo (1º etapa).....	47
4.4 Ensaio em reatores anaeróbios em batelada: Produção de bioprodutos (2º etapa)..	50
4.5 Ensaio de caracterização do substrato, do inóculo e dos reatores.....	52
4.5.1 Análises físico-químicas	52
4.5.2 Análise de quantificação do hidrogênio	52
4.5.3 Análises de metabólitos solúveis pelo método de headspace.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5. Caracterização do substrato e do inóculo.....	54
5.2 Digestão anaeróbia	55
5.2.1 Análise da eficiência da digestão anaeróbia para os diferentes inóculos: Escolha do inóculo (1º etapa)	55
5.2.1.1 Caracterização físico-química dos ensaios de digestão anaeróbia e eficiências de remoção em termos de DQO e SVT	55

5.2.1.2 Produção de hidrogênio	56
5.2.2 Análise da eficiência da digestão anaeróbia para o inóculo liofilizado: Produção de bioprodutos (2º etapa)	61
5.2.2.1 Caracterização físico-química dos ensaios de digestão anaeróbia e eficiências de remoção em termos de DQO e SVT	61
5.2.2.2 Produção de hidrogênio	62
5.2.2.3 Produção de ácidos orgânicos Voláteis (AOVs)	63
6 CONCLUSÕES.....	67
7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

As fontes alternativas de energia ganham cada vez mais destaque, pois além de diminuir os danos causados à natureza, elas são renováveis e ambientalmente mais limpas. A sociedade almeja a sustentabilidade, logo é preciso reduzir a dependência por combustíveis fósseis, bem como os resíduos e poluentes gerados. O uso de biocombustíveis tem se intensificado por força de lei em muitos países como uma tentativa a não dependência por combustíveis fósseis na matriz energética. No Brasil segundo a resolução nº 16 do conselho nacional de política energética (CNPE), publicada em diário oficial, ficou estabelecido que até 2026 a mistura de biodiesel no diesel será de 15% (BRASIL, 2023).

O mundo está cada vez mais preocupado em praticar políticas de proteção ambiental, visando principalmente a produção energética. Neste contexto, os biocombustíveis estão em evidência. O uso de biocombustíveis geralmente apresenta inúmeros benefícios, incluindo sustentabilidade, redução dos gases estufa, desenvolvimento regional, social e agrícola. Um combustível, em particular, que apresenta elevado potencial como biocombustível é o biodiesel. O biodiesel é obtido a partir de fontes biológicas renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais, é biodegradável e apresenta baixa emissão de gases tóxicos, além de apresentar vantagens muito interessantes, como a possibilidade real de substituir grande parte dos derivados do petróleo, diminuindo assim a dependência de combustíveis fósseis (GONÇALVES; PEREZ; ÂNGELO, 2009).

O biodiesel é um combustível composto de ésteres que pode ser obtido de diferentes tipos de óleos, que estimulados por um catalisador reagem quimicamente com um álcool, geralmente metanol ou etanol, para produzir ésteres (biodiesel) e glicerol. A possibilidade de mistura do biodiesel ao diesel convencional tem aumentado gradativamente a produção e consumo desse biocombustível, e consequentemente a geração de glicerol, subproduto de interesse para a geração de energia, pois corresponde a aproximadamente 10% da produção de biodiesel, um fator preocupante frente a este exacerbado crescimento, é o destino do glicerol excedente, já que para cada tonelada de biodiesel obtido são gerados 100 Kg de glicerol, provocando efeitos adversos à economia do biodiesel (GONÇALVES; PEREZ; ÂNGELO, 2009; DASARI et al., 2005).

O glicerol é um subproduto de muitos processos industriais tornando-se um substrato potencialmente atrativo para a produção biotecnológica de compostos de valor agregado. Uma alternativa para utilização do glicerol é a sua conversão em produtos de grande utilidade e com aplicações industriais, tais como hidrogênio, ácidos orgânicos, etanol e 1,3-propanodiol. A

transformação do glicerol por processos biotecnológicos pode ser uma escolha viável, uma vez que é crescente a busca por alternativas para sua utilização, evitando que se torne um problema futuro devido a sua acumulação (RIVALDI et al., 2007).

Vários microrganismos são capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono. Por isso, um dos destinos possíveis para o glicerol bruto resultante da indústria do biodiesel é seu uso na composição de meios de cultura para crescimento de microrganismos em processos biotecnológicos que levem à produção de moléculas de interesse econômico, como por exemplo: etanol, ácido succínico, ácido propiônico, ácido cítrico, pigmentos, biosurfactante, biopolímeros, etc. (SILVA et al., 2006). A utilização do glicerol como fonte de carbono, para produção de compostos químicos de interesse comercial, além de diminuir os possíveis impactos ambientais e melhorar a economia do setor de biodiesel, torna-se vantajoso pelo baixo custo deste substrato em relação a outros tradicionalmente utilizados como fonte de carbono para obtenção de bioprodutos (RIVALDI, 2007).

Nesta perspectiva, a biodigestão anaeróbia tem sido utilizada como uma alternativa de minimização de um passivo ambiental provindo principalmente da agroindústria. O principal produto deste processo é o biogás, cujo poder calorífico pode variar de 5000 a 7000 kcal m⁻³ dependendo da porcentagem de metano presente (OLIVER, 2008). Entretanto, este método de tratamento pode ser utilizado também para a geração ácidos orgânicos.

Os altos rendimentos de produção de hidrogênio são acompanhados pela produção dos ácidos acético e butírico, metabólitos solúveis gerados na acidogênese. Esses ácidos orgânicos no efluente podem ser empregados como substrato e fonte de carbono para processos de produção de metano (COHEN et al., 1979), produção de hidrogênio em reatores fotossintéticos (FASCETTI et al., 1998; TAKABATAKE et al., 2004; SHI et al., 2006), para a produção de biopolímeros (HASSAN et al., 1997; YU, 2001; YU et al., 2002, DU et al., 2004), e em processos de remoção de nutrientes biológicos tais como fósforo e nitrogênio (LIM et al., 2000; ELEFSINIOTIS et al., 2004).

Diante disso, diversos estudos vêm sendo realizado para valorização do glicerol bruto, não apenas para se minimizar um promissor passivo ambiental que devido sua alta produção não estar sendo assimilado com mesma velocidade pelo mercado, mas também o mesmo pode se afirmar como uma nova fonte de renda para a indústria do biodiesel, otimizando os recursos disponíveis. Logo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a obtenção de bioprodutos como hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis (AOVs) proveniente da fermentação anaeróbia, utilizando como fonte de carbono, para o metabolismo microbiano, o glicerol bruto do processo de transesterificação de óleos e gorduras residuais para a produção de biodiesel.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de bioprodutos como hidrogênio e ácidos orgânicos, oriundos da fermentação do glicerol bruto residual utilizando como inóculo efluente de suinocultura em reatores de batelada.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir glicerol bruto pelo processo de transesterificação de óleo de fritura fornecido pelo restaurante universitário da Universidade Federal de Alagoas;
- Avaliar a eficiência de diferentes variações de tratamento do inóculo de efluente de suinocultura;
- Quantificar a produção de bioprodutos de valor agregado (ácidos orgânicos e hidrogênio) durante a fermentação anaeróbia;
- Avaliar a eficiência de remoção de DQO e sólidos voláteis totais no processo.

3 REVISÃO BIBIOGRÁFICA

3.1 Glicerol, fonte orgânica, para produção de bioprodutos

O glicerol, um subproduto da produção de biodiesel, tem sido amplamente estudado como fonte orgânica para a produção de hidrogênio (H₂) e ácidos orgânicos através de processos fermentativos. Diversos microrganismos são capazes de metabolizar o glicerol, convertendo-o em produtos de valor agregado, como hidrogênio, ácido acético, ácido butírico, ácido succínico, ácido valérico entre outros.

A Tabela 1 mostra alguns trabalhos produzidos a partir da fermentação do glicerol para produção de bioprodutos de maior valor agregado.

Tabela 1- Estudos da fermentação anaeróbia do glicerol para produção de bioprodutos.

SUBSTRATO	CULTURA	BIOPRODUTO	AUTOR
Glicerol	<i>Clostridium pasteurianum</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i>	Hidrogênio	Silva et al., 2020.
Glicerol	<i>Clostridium</i> sp. SH25	Hidrogênio	Kim, 2022.
Glicerol	<i>Clostridium butyricum</i>	Ácido acético	Lima et al., 2019.
Glicerol	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ácido láctico	Barros et al., 2021.
Glicerol	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Ácido succínico	Souza et al., 2018.
Glicerol	Cultura mista	Hidrogênio e ácidos orgânicos	Pereira et al., 2019.

Fonte: Autor, 2024.

De acordo com os estudos, pode-se observar que, a partir do inóculo utilizado no processo de fermentação do glicerol, é possível obter diferentes produtos, como hidrogênio, ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, entre outros) além de biocombustíveis, como etanol. Sendo assim, o inóculo desempenha um papel fundamental no processo fermentativo, pois a escolha adequada do consórcio microbiano ou da cepa específica determina a eficiência da conversão e o tipo de produto final obtido. Logo, deve-se escolher um inóculo que seja adequado ao produto desejado, levando em consideração fatores como as

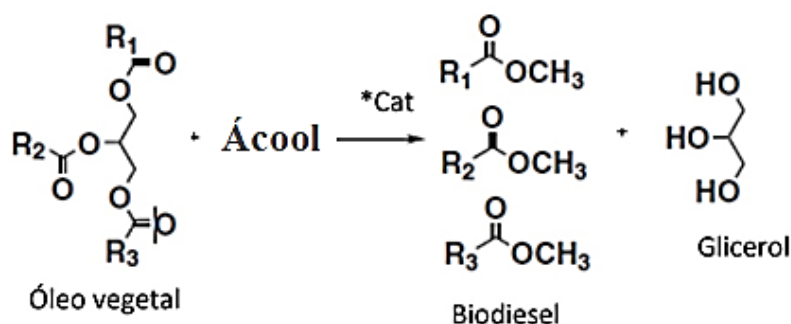
características do microrganismo, sua capacidade metabólica, condições de cultivo (como pH, temperatura e nutrientes).

3.1.1 Glicerol bruto

A crescente produção brasileira de biodiesel deve-se principalmente à lei 11.097/2005 que tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel até 2008 e adição de 5% em 2013 (LEONETI et al., 2012), sendo que até o ano de 2026 a estimativa é que este valor aumente para 15%. Estima-se que diante dessa lei o excedente de glicerol no país em 2013 tenha ultrapassado a produção de 250.000 toneladas (BEATRIZ et al., 2011; UMPIERRE; MACHADO, 2013). Para o ano de 2020, a estimativa foi que a produção mundial de glicerol chegou a três milhões de toneladas, enquanto que sua demanda não deve ter ultrapassado a 500 mil toneladas/ano (LIN, 2013). Portanto, destinação do glicerol é um problema para a produção do biodiesel, sendo fundamental buscar formas de consumo deste glicerol (LEONETI et al., 2012).

A utilização do biodiesel diminui problemas ambientais como, por exemplo: evita-se utilizar combustíveis fósseis com reservas limitadas, diminui a emissão de substâncias tóxicas pelos escapamentos de motores e o biodiesel é degradado mais facilmente (PLÁ, 2002). Durante sua fabricação ocorre a reação de um álcool com uma gordura ou óleo – transesterificação com a formação de ésteres (biodiesel), ácidos graxos e glicerol. Para cada três mols de ésteres é gerado um mol de glicerol, ou seja, aproximadamente 10% da massa do produto formado (KARINEN; KRAUSE, 2006; MOTA et al., 2009; BEATRIZ et al., 2011, QUISPE et al., 2013). Esta reação pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.



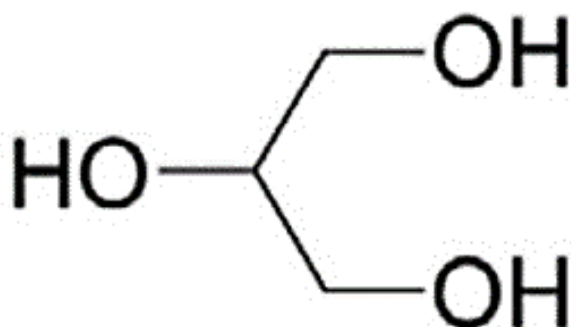
Fonte: Adaptado de Mota et al., 2009.

As aplicações do glicerol bruto, oriundo da fabricação do biodiesel, vão da fabricação de novos produtos químicos, passando pela fabricação de aditivos para combustíveis de automóveis, metanol, alimento para animais. Além disso, o glicerol pode ser usado como fonte de carbono para a produção de H_2 , dihidroxicetona, ácido succínico, ácido propiônico e ácido cítrico (LEONETI et al., 2012).

Diante disso, a produção de bioprodutos por bioconversão do glicerol residual vem sendo estudada por diversos pesquisadores, a fim de, utilizar o resíduo para produção de outros produtos de maior valor agregado e consequentemente a não acumulação do mesmo no meio ambiente.

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

Figura 2 - Estrutura do glicerol.



Fonte: Beatriz et al., 2011.

O glicerol bruto é um subproduto gerado em grandes quantidades no processo de produção de biodiesel. Durante a transesterificação dos óleos vegetais ou gorduras animais para a fabricação do biodiesel, aproximadamente 10% do volume total do produto final corresponde ao glicerol. No entanto, esse glicerol bruto contém várias impurezas, como metanol, água,

catalisadores, sais e outros compostos orgânicos, o que limita sua aplicação direta em muitos processos industriais sem tratamento prévio.

No Brasil, a produção de glicerol bruto, um subproduto da fabricação de biodiesel, tem desempenhado um papel significativo no mercado de exportação. Em 2023, a exportação de glicerina (tanto em bruto quanto destilada) manteve-se forte, com um total de 46,5 mil toneladas exportadas já no início do ano, marcando janeiro como um dos melhores meses para esse mercado desde 1997. Esse aumento nas exportações reflete uma demanda crescente pelo produto, especialmente por parte da China, que continua a ser o principal destino (BIODISELDATA, 2023).

Além disso, estima-se que o Brasil tenha exportado 283 mil toneladas de glicerina bruta, com uma receita total de aproximadamente 46,3 milhões de dólares, uma redução de 52,7% em relação a 2018, devido à maior oferta no mercado e a consequente queda dos preços internacionais. A adoção de níveis crescentes de mistura de biodiesel no país, como o B14, impulsionou ainda mais a geração desse subproduto (BIODISELDATA, 2023).

O termo glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95% (QUISPE et al., 2013). Esta tem aplicação em larga escala nos setores: cosmético, higiene pessoal, alimentos, medicamento, fumo, crioprotetores e na indústria têxtil (ARRUDA et al., 2007; MOTA et al., 2009). Para que o glicerol atinja este grau de pureza, ele deve ser submetido à destilação, o que agrega alto custo ao processo (RIVALDI et al., 2007). As propriedades físico-químicas do glicerol estão representadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C.

Propriedades do glicerol	
Peso molecular	92,09 g mol ⁻¹
Densidade	1,261 g cm ⁻³
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de fusão	18,2°C
Ponto de ebulição	290°C
Tensão superficial	64,00 mN m ⁻¹
Calor específico	4,32 kcal g ⁻¹
Coeficiente de temperatura	-0,0598 mN (mK) ⁻¹
Ponto de fulgor	160°C

Fonte: Adaptado de Beatriz et al., 2011.

O glicerol bruto, por conta de suas impurezas, necessita de processos de purificação para ser utilizado em aplicações de maior valor agregado. Lima et al. (2019) discutem a composição do glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel e os desafios para sua utilização direta em processos industriais. Eles destacam que a presença de metanol e sais reduz a eficiência de muitos processos biotecnológicos, o que torna a purificação uma etapa essencial para ampliar as possibilidades de uso (LIMA; SANTOS; MORAIS, 2019).

Apesar das impurezas, várias pesquisas têm demonstrado que o glicerol bruto pode ser utilizado diretamente em processos de fermentação para a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos. Silva et al. (2020) estudaram a fermentação do glicerol bruto para a produção de hidrogênio, destacando que, embora a presença de impurezas possa afetar o rendimento do processo, a utilização do glicerol residual de biodiesel como substrato representa uma alternativa econômica e sustentável para a produção de bioenergia (SILVA; DIAS; SCHWAN, 2020).

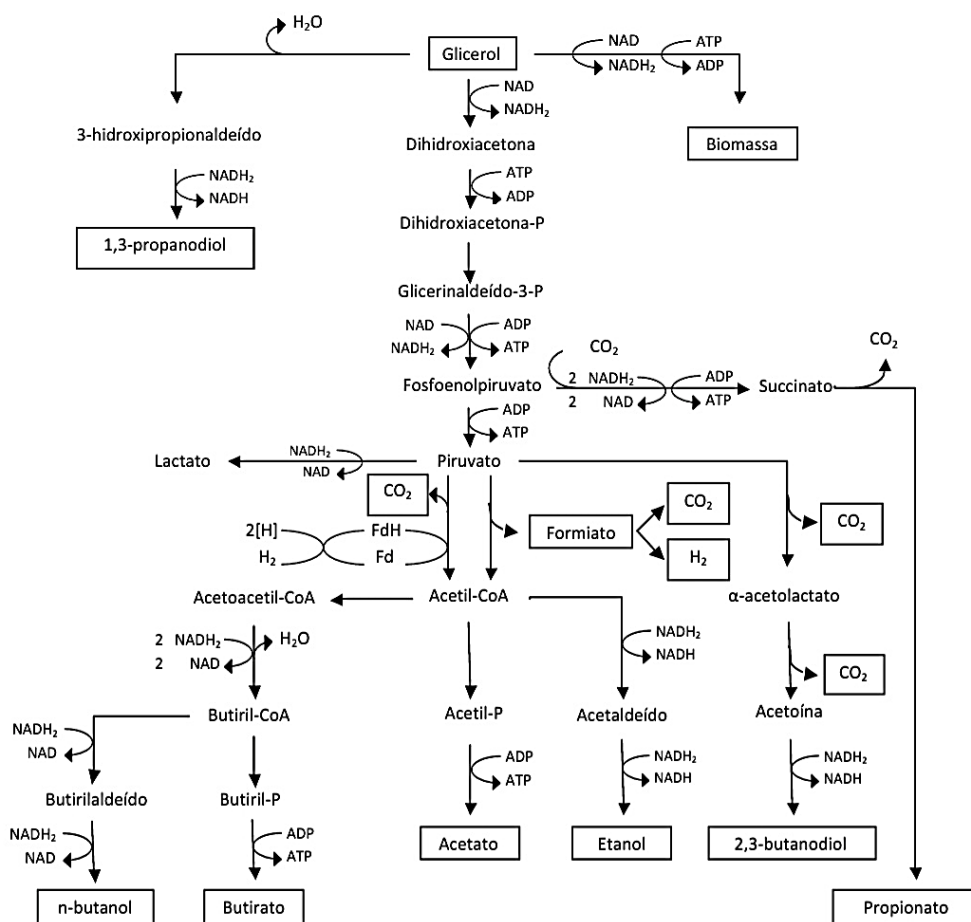
A utilização do glicerol bruto em processos industriais, especialmente em fermentação, pode ser vantajosa do ponto de vista econômico, uma vez que elimina ou reduz os custos associados à purificação. Entretanto, Pereira et al. (2019) destacam que o nível de impurezas do glicerol bruto pode inibir a atividade de microrganismos fermentativos, sendo necessário otimizar as condições de cultivo para mitigar esses efeitos negativos (PEREIRA; REIS; OLIVEIRA, 2019).

Estudos demonstram que o glicerol em sua forma bruta contém elementos nutricionais (fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio) que podem ser usados por microrganismos durante seu crescimento em fermentações, o que baixa consideravelmente o preço do processo, uma vez que carboidratos puros, como a glicose, por exemplo, possuem um preço superior (ARRUDA et al., 2007; RIVALDI et al., 2007; SABARATNAM; ALI HASSAN, 2012).

3.2 Bioprodutos gerados na digestão anaeróbia do glicerol

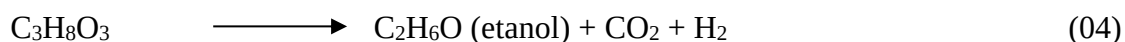
O metabolismo do glicerol e produção de hidrogênio podem ser dados por meio de duas rotas, a oxidativa e a redutiva (Figura 3). Na rota redutiva o glicerol é convertido em 1,3-propanodiol (1,3-PD) e na rota oxidativa poderá gerar diversos produtos, como ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, etanol, butanol entre outros isso vai depender dos microrganismos presentes e das condições ambientais (DROŹDŹYŃSKA et al., 2011 e SARMA et al., 2012).

Figura 3 - Rota fermentativa do glicerol.



Fonte: Viana, 2016.

Na maioria das vias de bioconversão do glicerol, o H_2 é gerado juntamente com os diferentes metabolitos durante o metabolismo oxidativo (Eq. 01 - Eq. 04) (SARMA et al., 2012).



O 1,3-PD ($C_3H_8O_2$) é um monômero de diol, o qual é um composto químico conhecido para aplicações em cosméticos, solventes, adesivos, detergentes e resinas. Também pode ser aplicado na síntese de tereftalato de polítrimetileno (PTT), poliuretanos, poliéteres e compostos heterocíclicos, como indol e quinolonas (VIVEK et al., 2017).

O ácido acético (CH_3COOH), que, é encontrado no vinagre, mas também pode ser usado como solvente, em tinturaria, perfumaria, na produção de corantes, na fabricação de acetonas, em tintas, na seda sintética, na produção de acetato de vinila (do qual se obtém o plástico PVA), de ésteres, de acetato de celulose (fibras têxteis), de acetatos inorgânicos, de anidrido acético e cloreto de etila (usados em sínteses orgânicas) e em medicamentos (MARQUES, 2021).

O ácido propiônico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$) é um ácido carboxílico que é usado na síntese de vitamina E, fibras de celulose, sabores artificiais de frutas, fragrâncias, perfumes, termoplásticos, drogas antiartríticas, atividade inibitória contra fungos, agentes antifúngicos em alimentos e rações, solventes e herbicidas. Seus sais são amplamente utilizados como conservantes de alimentos e rações (ZHANG et al., 2015; VIVEK et al., 2017; WANG e YANG, 2013).

O ácido butírico ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) é usado na indústria farmacêutica, na síntese de aromáticos e em agentes emulsificantes e plastificantes. É naturalmente encontrado na manteiga. Os ésteres e sais do ácido butírico são usados em uma variedade de aplicações, incluindo perfumes, aromas e aditivos para alimentação animal (MARQUES, 2021).

O etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) é utilizado em termômetros, como solvente, combustível, etc. (GARLAPATI et al., 2016).

O butanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) é um solvente frequentemente aplicado a reações de formação de éster e éter. Pode ser aplicado em commodities químicas, materiais e têxteis, por exemplo, na produção de tintas (2-butoxietanol), butil acrilato (produto químico em massa) e plastificante dibutylsebacato. Apresenta vantagens sobre outros bioprodutos orgânicos simples, tornando-se um novo biocombustível (KRASŇAN et al., 2018).

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

3.3 Efluente de suinocultura

O aumento da produção brasileira de suínos tem sido significativo nas últimas duas décadas, impulsionado por avanços tecnológicos e maior competitividade no setor (NGUYEN et al., 2024). Essa expansão resultou em um aumento proporcional no volume de dejetos suínos, gerando preocupações crescentes sobre os impactos ambientais e à saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento (JOHNSON et al., 2024).

Cada suíno produz, em média, cerca de 2,5 kg de fezes por dia, e o total de resíduos, incluindo urina e água excedente, chega a aproximadamente 9 kg por animal (FERNANDEZ

et al., 2024). Este aumento de resíduos tem levado a um maior foco em tecnologias de tratamento e gestão sustentável.

Durante a 26^a Conferência das Partes da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (COP26), foi acordada a meta global de redução de 30% das emissões coletivas de metano. No Brasil, o Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono (Plano ABC+) e o Manejo de Resíduos da Produção Animal (MRPA) são iniciativas importantes que incentivam a utilização de dejetos suínos para a geração de energia e biofertilizantes. Tecnologias emergentes, como a compostagem e a digestão anaeróbica, continuam a ser destacadas como soluções eficazes para a gestão desses resíduos e redução das emissões de gases de efeito estufa (KUNZ et al., 2022; NGUYEN et al., 2024).

Alguns estudos que utilizaram apenas o esterco de porco como substrato em processo de monodigestão observaram dificuldades devido aos altos índices de nitrogênio em relação ao carbono orgânico disponível (WANG et al., 2012; YIN et al., 2015). O elevado teor de nitrogênio pode gerar um alto nível de amônia tóxica. Com isso, materiais ricos em carbono orgânico precisam ser adicionados ao esterco de suínos para fornecer a carbono orgânico necessário (OJEDIRAN et al., 2021).

Os principais parâmetros para o aperfeiçoamento da produção de bioprodutos no processo de digestão anaeróbia devem ser mantidos em condições estáveis. Desta maneira, o acompanhamento da temperatura, pH, tamanho das partículas, relação C/N, dentre outros, são importantes para maximizar o desempenho dos microrganismos presentes no sistema (SIDDIQUE; WAHID, 2018a). Atualmente, diversos trabalhos concernentes à avaliação de diferentes processos de estabilização dos resíduos de suínos têm sido publicados.

Campos et al. (2005a), operando sistema de bancada alimentado com água residuária de suinocultura, constituído por tanque de acidificação e equalização, reator UASB e lagoa aerada facultativa, dispostos em série, com tempo de detenção hidráulica (TDH) no reator UASB igual a 30h, observaram eficiências de 75 e 78%, para a remoção de DQO_{total} e DBO₅, respectivamente, considerando apenas a remoção obtida no reator UASB.

Campos et al. (2005b), considerando o sistema completo, observaram eficiências para remoção da DQO_{total} e sólidos voláteis totais da ordem de 84 e 73%, respectivamente. Cabe acrescentar que, em ambos os casos, a temperatura de operação do reator UASB foi mantida em 30°C, por meio de um sistema de aquecimento do afluente.

Santana e Oliveira (2005), operando um sistema anaeróbio em dois estágios, em escala piloto, alimentado com efluente líquido de suinocultura, composto por dois reatores UASB em

série (705 e 175 L), relataram eficiência na remoção de DQO_{total} de até 92,7%, para um TDH total de 30h, operando com concentração de DQO_{total} afluente igual a 9.625 mg L^{-1} . Os mesmos autores, em outra fase do experimento, operando com DQO_{total} afluente da ordem de 18.717 mg L^{-1} , relataram eficiência do sistema da ordem de 86,6%.

Belli Filho et al. (2001), utilizando dejetos de suínos peneirados (0,1 mm) e equalizados, na alimentação de um reator UASB em escala piloto, operado durante 150 dias, com TDH de 36h e carga orgânica volumétrica (COV) de $2,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, encontraram valores, para a eficiência de remoção de DQO_{total} , da ordem de 85%. Esses autores concluíram que o reator UASB pode ser uma alternativa às lagoas anaeróbias, por apresentar menor TDH. Em se tratando da estabilização de efluentes suinícolas por meio de lagoas anaeróbias, esta tecnologia pode alcançar eficiências entre 50 e 80% na remoção de DBO_5 .

Com isso, a digestão anaeróbia surge como alternativa para atender a demanda do efluente de suinocultura. A geração de uma energia limpa pode contribuir tanto para o meio ambiente como também em uma futura crise energética. Para os agricultores, pode contribuir diretamente para o desenvolvimento sustentável em áreas rurais, garantindo aos mesmos uma nova oportunidade de obter lucros (CAVINATO et al., 2010).

3.4 Inóculo: Características e fontes para digestão anaeróbia

A biodigestão anaeróbia, utilizando biodigestores, é um processo que demanda tempo para a bioestabilização dos resíduos. A introdução de inóculos tem sido uma estratégia eficaz para otimizar e acelerar esse processo. Inóculos fornecem uma população adicional de microrganismos específicos da biodigestão anaeróbia, o que pode aumentar a atividade microbiana, melhorar a produção de biogás e reduzir o tempo necessário para a estabilização dos resíduos (PAES et al., 2017; XAVIER; LUCAS JÚNIOR, 2010).

Culturas puras de bactérias, como as do gênero *Clostridium* e *Enterobacter*, têm sido amplamente estudadas devido à sua capacidade de produzir hidrogênio e metano a partir de diversos substratos. *Clostridium*, uma bactéria Gram-positiva, e *Enterobacter*, uma Gram-negativa, são eficazes na produção de hidrogênio em condições de pH próximas a 5,8-6,0 e temperatura de 37°C . Além disso, a bactéria *Thermotoga* tem sido pesquisada para produção de hidrogênio sob condições termofílicas, a 80°C e pH 7,0-7,4 (WANG; WAN, 2009; LI et al., 2007).

Atualmente, o uso de culturas mistas de bactérias como inóculo tem se mostrado mais prático e eficiente do que culturas puras. Culturas mistas são mais fáceis de operar e controlar,

e têm uma maior diversidade de microrganismos que podem utilizar uma gama mais ampla de substratos (LI et al., 2007; WANG; WAN, 2009).

Uma ampla gama de fontes microbianas tem sido utilizada como inóculo na produção de hidrogênio, incluindo o esgoto de estação de tratamento de águas residuais, dejetos bovinos, lamas de esgoto, entre outros (WANG et al., 2011). No entanto, juntamente com os microrganismos produtores de hidrogênio, há também a presença da microflora consumidora deste gás, cuja existência se dá de forma natural no ecossistema. Isso pode ser suprimido por pré-tratamentos usando métodos adequados, tais como calor, ácido, base, agentes químicos, para enriquecer a microflora produtora de hidrogênio (SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

O Brasil continua a ser um dos principais produtores e consumidores de carne suína no mundo. De acordo com dados mais recentes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2023 o consumo per capita de carne suína no Brasil foi de aproximadamente 13,2 kg, refletindo um aumento em relação aos anos anteriores. O total de carne suína consumida no país foi estimado em cerca de 3.500 milhões de toneladas (OECD-FAO, 2023).

A suinocultura no Brasil tem experimentado um crescimento contínuo, impulsionado por melhorias tecnológicas e expansão da demanda interna e externa. Esse crescimento é acompanhado por desafios ambientais significativos, uma vez que a suinocultura é frequentemente associada a elevados impactos ambientais, como a poluição da água e do solo devido ao manejo inadequado de dejetos. Estudos recentes, como os de Silva et al. (2023) e Oliveira et al. (2024), continuam a destacar a necessidade de melhores práticas de manejo para mitigar esses impactos.

3.5 Pré-tratamento de culturas mistas para a geração de H₂

Em um sistema de culturas mistas, sob condições anaeróbias, o hidrogênio produzido pelas bactérias, tais como o *Clostridium* ou *Enterobacter*, é na maioria das vezes rapidamente consumido por certos microrganismos. Assim, a fim de se aproveitar o hidrogênio gerado deste sistema de culturas mistas, o lodo, por exemplo, necessita passar por um processo de pré-tratamento para suprimir a atividade das espécies consumidoras de hidrogênio preservando ao mesmo tempo a atividade das bactérias geradoras deste gás (LI; FANG, 2007).

A produção biológica de hidrogênio por fermentação escura compartilha muitas características em comum com a digestão anaeróbia metanogênica. Culturas mistas tipicamente

anaeróbias podem não produzir hidrogênio uma vez que ele é rapidamente consumido pelos microrganismos produtores de metano. Por isso, há a necessidade de se restringir a metanogênese permitindo que o hidrogênio se torne o produto final do fluxo metabólico. Assim, os métodos de pré-tratamento dos microrganismos são essenciais como forma de selecionar grupos específicos de bactérias (ROSSI et al., 2011). Bactérias produtoras de hidrogênio formadoras de endósporos, como as pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, formam endósporos como um resultado do estresse bacteriano quando em condições ambientais desfavoráveis, como alta temperatura, limitação de nutrientes, acidificação e alcalinidade, por exemplo, que são as condições impostas durante os pré-tratamentos dos inóculos (ROSSI et al., 2011).

A esporulação é um processo de diferenciação, considerado um fenômeno complexo, que leva à formação de endósporos dormentes que são capazes de sobreviver milhares, senão milhões de anos. Os endósporos bacterianos não possuem metabolismo e podem suportar uma ampla variedade de condições adversas como calor, exposição à radiação ultravioleta e contato com solventes enquanto que as espécies metanogênicas, que geram metano e consomem hidrogênio, não possuem tais capacidades que acaba por prevenir o crescimento competitivo destes microrganismos. Apesar desta dormência extrema, os endósporos mantêm um mecanismo sensorial em alerta, o que lhes permite responder aos nutrientes específicos quando em condições ambientais ideais para sua reativação (ATRIH; FOSTER, 2002; ROSSI et al., 2011).

Vários pré-tratamentos das culturas mistas são encontrados na literatura. Rossi e colaboradores (2011) desenvolveram uma pesquisa investigando a influência de diferentes métodos de pré-tratamentos para a seleção de consórcios de bactérias geradoras de hidrogênio a partir do glicerol residual da síntese de biodiesel. Os cinco tratamentos químicos estudados por este autor e aplicados ao consórcio foram: choque térmico, no qual o lodo foi fervido a 100°C por 15 minutos; o tratamento com ácido e base, por meio de um ajuste do pH a 3,0 ou 10,0 usando 1M HCl ou NaOH e mantendo este pH por 24h; o calor seco e dessecação foi realizado armazenando a amostra por 2 horas em um forno de secagem à 105°C seguido por uma dessecação em uma jarra de dessecação por 2 horas; o congelamento e o descongelamento foi realizado pela exposição das amostras à -10°C por 24 horas seguido por um descongelamento por 6 horas à 30°C. De acordo com o autor, tratamentos à quente são os melhores métodos de serem garantidas as maiores gerações de hidrogênio. Para Selembo et al. (2009), o tratamento térmico é o pré-tratamento mais comum e que pode ser facilmente empregado para a seleção de bactérias geradoras de hidrogênio.

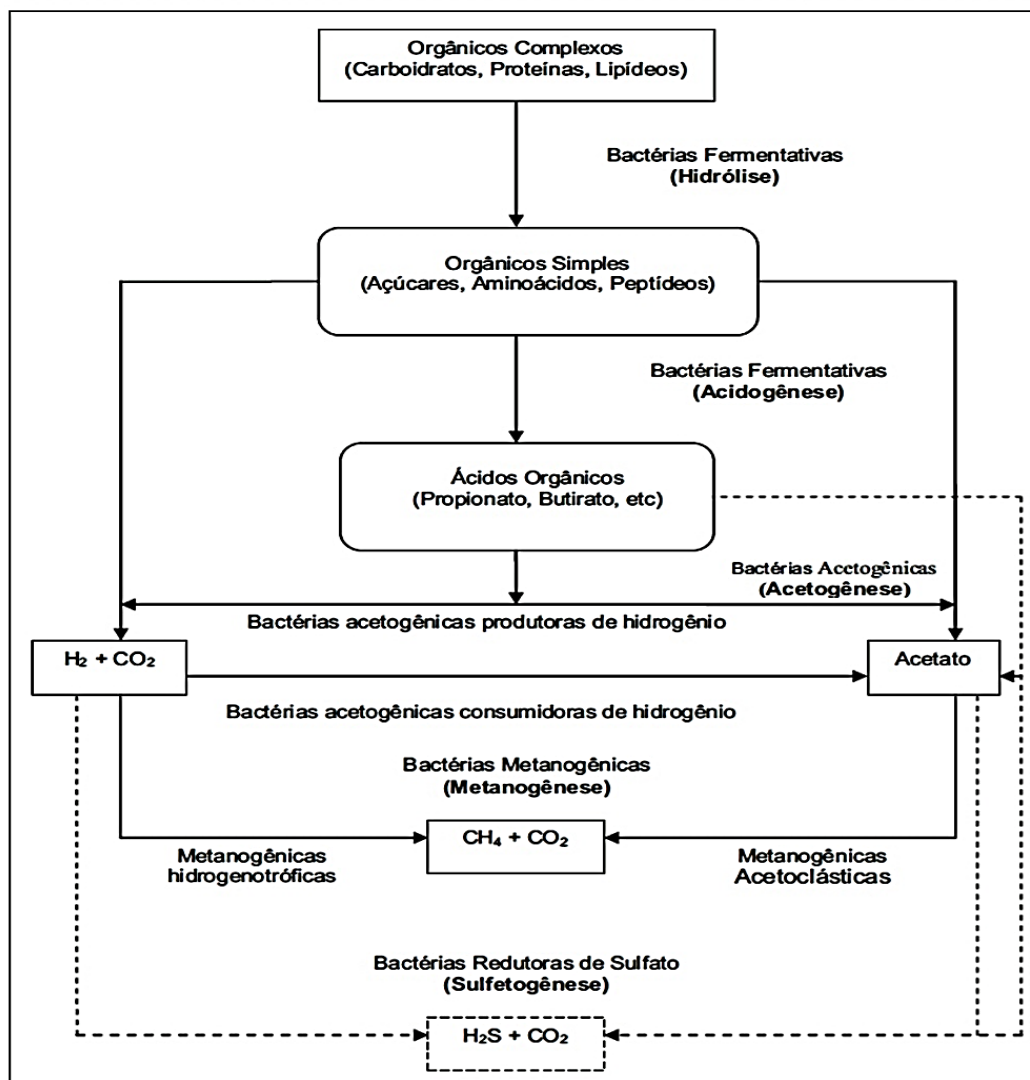
Além dos cuidados a serem tomados com o inóculo, para que se tenham bons rendimentos de hidrogênio gerado é importante que se realize o pré-tratamento do glicerol bruto, pois de acordos com Santos et al., (2013) e Chi et al., (2007) o glicerol é um substrato inadequado para o processo fermentativo quando utilizado sozinho, por possuir concentrações elevadas de carbono (aproximadamente 1500 g DQO L⁻¹), além de ser pobre em nutrientes e possuir elevada viscosidade. Após o pré-tratamento para a eliminação destes resíduos, há a possibilidade de sua reutilização para produção de mais biodiesel por meio de esterificação e transesterificação. Sendo assim, toda a matéria orgânica não glicerol que foi separada do glicerol bruto por meio do pré-tratamento, pode voltar ao processo de obtenção de mais biodiesel (SANTORI et al., 2012).

3.6 Aspectos gerais do processo de fermentação anaeróbia

A fermentação consiste em um processo biológico no qual um consórcio de microrganismos ou cultura pura promove a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos isobutírico, propiônico, acético e butírico), álcoois (etanol, butanol), H₂ e CO₂ (SÁ et al., 2014).

A degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios envolve a cooperação de diferentes microrganismos. Quatro etapas principais são responsáveis por essa degradação: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 4). A etapa inicial corresponde à hidrólise, onde bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais particulados complexos em materiais mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Durante a etapa acidogênica, os produtos solúveis oriundos da etapa anterior são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples, sendo eles os ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO₂ e H₂. Na etapa seguinte, as bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado (H₂ e ácido acético) para as arqueias metanogênicas, onde o H₂ pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. A última etapa do processo corresponde à presença das arqueias metanogênicas, que convertem o H₂ e o ácido acético em CH₄ e CO₂. Em função de sua afinidade pelo substrato, as arqueias metanogênicas podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas (arqueias que utilizam o ácido acético como substrato) e metanogênicas hidrogenotróficas (arqueias que utilizam o hidrogênio como substrato) (SÁ et al., 2014).

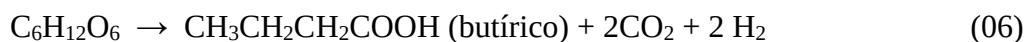
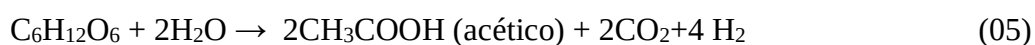
Figura 4 - Etapas da fermentação anaeróbia.



Fonte: Marques, 2018.

3.6.1 Acidogênese

O modelo matemático proposto por Mosey (1983) sobre o processo de digestão anaeróbia e seus mecanismos reguladores de produção de ácidos orgânicos a partir de glicose sugeriu que as bactérias acidogênicas produzem os ácidos acéticos, propiônico e butírico de acordo com os níveis de hidrogênio no biogás, como mostrado nas equações:





A reação de conversão de glicose para ácido acético ocorre preferencialmente, uma vez que essa reação fornece às bactérias acidogênicas um maior rendimento de energia para o crescimento, além de prover substrato ao grupo posterior, das bactérias metanogênicas acetoclásticas, para a produção de metano. As demais reações, de formação de ácido butírico e propiônico são as respostas das bactérias à acumulação de hidrogênio durante sobrecargas. O desvio do metabolismo da glicose em direção ao ácido butírico reduz tanto a produção de hidrogênio quanto o teor ácido no sistema. A formação de ácido propiônico requer o consumo de hidrogênio e, assim há o controle do potencial redox durante as sobrecargas (MOSEY, 1983).

A Figura 5 fornece a principal via metabólica para a conversão de glicose para ácidos orgânicos. As bactérias acidogênicas usam essa via para obter energia da oxidação da glicose para ácido acético. Durante o curso dessa oxidação, átomos de hidrogênio removidos da glicose são transferidos primeiramente para moléculas de NAD^+ (forma oxidada de transportadores de elétrons) convertendo-as para NADH (forma mais reduzida) e então são liberados para a solução como gás hidrogênio dissolvida (MOSEY, 1983).

Sob condições iniciais de operação, a concentração de hidrogênio no digestor é muito baixa e o metabolismo da glicose é direcionado quase inteiramente em direção a formação de ácido acético. Como a concentração de hidrogênio aumenta, a falta de formas oxidadas de NAD^+ desacelera a velocidade global de fermentação (lado A da Figura 5) e uma abundância de formas reduzidas de NADH acelera as reações para os lados C e D na mesma figura. O efeito global do aumento na concentração de hidrogênio no digestor reduz a velocidade global de formação de ácido acético e muda a mistura de ácidos produzidos, diminuindo a proporção de glicose convertida para acético e aumenta a proporção convertida para propiônico e butírico (MOSEY, 1983).

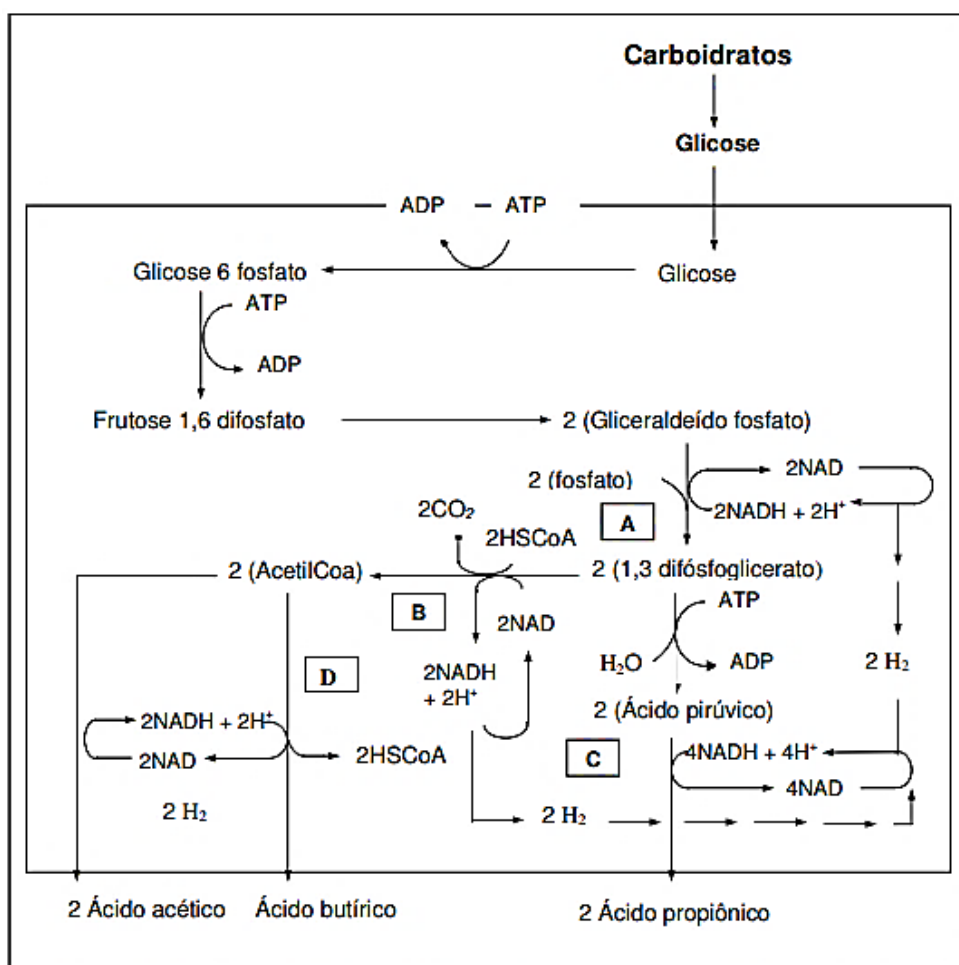
Além disso, Harper e Pohland (1986) afirmam que o acúmulo de hidrogênio, em quantidade acima da capacidade assimilativa coletiva desses organismos, torna necessária a presença de um método alternativo de disposição de elétrons que possibilite a regeneração do NADH. Essa necessidade, segundo os autores, é preenchida pela fermentação de piruvato a propionato, lactato e etanol ou pela fermentação do Acetil-CoA a ácido butírico.

De acordo com Terracino e Kashket (1986) para o *Clostridium acetobutyricum*, a troca do metabolismo acidogênico para solventogênico ocorre em pH abaixo de 5,0. Durre (1998) sugere que os ácidos são formados exclusivamente durante o crescimento exponencial dos microrganismos e que a solventogênese é iniciada na transição da fase de crescimento

estacionário. Oliveira (1993) afirma que valores baixos de pH ocasiona redução da população de microrganismos metanogênicos.

As bactérias acidogênicas usam glicose não somente como fonte de energia, mas também como fonte de carbono para o metabolismo de novas células e o hidrogênio também controla as velocidades de conversão de ácido propiônico e butírico a ácido acético (MOSEY, 1983).

Figura 5 - Caminho metabólico dentro das bactérias formadoras de ácidos orgânicos.



Fonte: Mosey, 1983.

3.7 Fatores que influenciam o processo fermentativo anaeróbia

Os processos anaeróbios, são autorregulados e dependente de diversos fatores. Durante a operação dos reatores, alguns parâmetros operacionais devem ser ajustados visando uma melhor eficiência dos processos e consequentemente um melhor rendimento na produção

de H_2 . Entre eles, pode-se citar: temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica, substrato, entre outros. (WANG; WAN, 2009).

3.7.1 Temperatura

A temperatura causa efeitos significativos nas comunidades microbianas, interferindo na estabilidade do processo e na produção do biogás (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). De acordo com Chernicharo (2007), dos fatores físicos que afetam o crescimento microbiano, a temperatura é um dos mais importantes na seleção das espécies.

De acordo com Kwietniewska e Tys (2014) em relação à temperatura, a biodigestão anaeróbia é geralmente classificada em processos psicrófilos (10 a 20 °C), mesofílicos (20 a 45 °C) e termófilos (45 a 65 °C). De acordo com Ferrer et al (2008) Devido aos gastos com energia e estabilidade do processo a digestão anaeróbia mesofílica é mais utilizada. No entanto, a digestão anaeróbia termofílica é mais eficiente em termos da remoção da matéria orgânica e produção de metano.

Conforme estudos da temperatura ideal para produção de hidrogênio fermentativo, constataram que as condições na faixa do mesofílico e termofílico favorecem a geração de hidrogênio (WANG; WAN, 2009).

A temperatura ótima para cada processo vai depender do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos realmente biodegradáveis e das condições operacionais do sistema (GUO et al., 2010). A Tabela 4 apresentam alguns estudos que investigaram o efeito da temperatura na produção de H_2 .

Tabela 3 - Estudo da temperatura na produção de H_2 fermentativo.

Inóculo	Substrato	Temperatura estudada	Temperatura ótima	Referências
Lodo de esgoto municipal	Xilose	30-55	50	LIN, WU e HUNG, 2008a
Lodo anaeróbio	Glicose	33-41	41	MU et al., 2006a
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Sacarose	25-45	35	WANG, MU e YU, 2005
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Glicose	20-44	37	XING et al., 2008
<i>thermosaccharolyticum</i>	Sacarose	40-80	60	O-THONG et al., 2008
Esgoto sanitário	Glicerol	45-55	55	Marques, 2021.

Fonte: Adaptado de De Sá, 2011.

3.7.2 pH

O pH desempenha um papel importante na biodegradação anaeróbia. Ele influencia a atividade da hidrogenase bem como a via metabólica, sendo também, um fator crucial para a supressão das atividades das metanogênicas que consomem hidrogênio, por isso a relevância de o meio nutriente conter uma solução tamponante (ANGELIDAKI; SANDERS, 2004; LI; FANG, 2007).

O pH inicial ideal para a produção fermentativa de hidrogênio relatado por Khanal et al. (2004) foi 4,5, enquanto o relatado por Lee et al. (2002) foi 9,0. Possivelmente o desacordo se deu pela diferença entre esses estudos nos termos do inóculo, substrato e faixa de pH inicial. Para bactérias hidrolíticas e acidogênicas a faixa ideal é de 5,2 a 6,3, enquanto para as acetogênicas e as arqueas metanogênicas a faixa é de 6,5 a 8. De uma forma geral, estudos apontam o pH ideal no intervalo de 5,2 a 7,0 com uma média de pH 6,0 para a conversão de hidrogênio a partir de carboidratos (LI; FANG, 2007).

O pH dentro da faixa supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H₂, bem como permite a inibição dos microrganismos consumidores de H₂ presentes no meio fermentativo. O pH afeta não somente o rendimento da produção de H₂, mas também modifica o espectro de subprodutos formados, bem como promove alterações nas comunidades bacterianas presentes no meio fermentativo (SILVA, 2017).

Durante a fase de hidrólise e acidogênese o pH varia entre 5,5 a 6,5, pelo acúmulo de ácidos orgânicos, mas não resulta sempre em decréscimo de pH devido à capacidade tampão do substrato ou da mistura dos substratos (WANG; WAN, 2009).

Temudo et al. (2008) em seus estudos do processo fermentativo com glicose, xilose e glicerol a 30 °C observaram que em pH baixo (< 6), os principais metabólitos formados consistiam em ácidos orgânicos, por exemplo, ácidos butírico e acético, enquanto que em elevados valores de pH o espectro de produtos formados mudava para ácido acético e etanol. Os autores também observaram que em ambas as condições, pH baixo ou elevado, havia a predominância de espécies do gênero *Clostridium*, enquanto em valores intermediários de pH havia uma maior diversidade microbiana no meio fermentativo. Além de preocupação com o pH inicial, estudos têm sido conduzidos envolvendo o controle e manutenção do pH durante todo o processo fermentativo, de modo a viabilizar a geração de bioprodutos de interesse, uma vez que a acumulação de ácidos intermediários provenientes do metabolismo implicará na acidificação e consequente queda do pH, inviabilizando o processo fermentativo (FANG; LIU,

2002; WANG et al.,2005; MU et al., 2006 e SÁ et al.,2014). Logo, a utilização de solução tampão é uma forma de amenizar as variações de pH do meio reacional.

3.7.3 Pressão parcial de hidrogênio

A pressão parcial de hidrogênio no reator é um dos fatores que afeta a produção de bioprodutos por via fermentativa.

De acordo com Hallenbeck (2009) elevada pressão parcial de H_2 no meio fermentativo pode favorecer a formação de compostos orgânicos, pois de acordo com Valdez-Vazquez (2016) a pressão parcial no *headspace* altera o fluxo de elétrons nas reações químicas.

Diversos estudos têm sido conduzidos de modo a diminuir a pressão parcial de H_2 na fase líquida, favorecendo deste modo, a síntese de H_2 . Ngo, Kim e Sim (2011) aumentaram a produção de H_2 de 1,23 para 2,73 mol de H_2 /mol de glicerina através de purgas de N_2 no meio fermentativo. Mizuno e colaboradores (2000) reduziram a concentração do H_2 dissolvido no meio fermentativo através de purgas com N_2 , obtendo um aumento de 68% no rendimento de H_2 . Lay (2000) aumentou a velocidade de agitação de um reator contínuo através de um agitador magnético, de 100 para 700 rpm e observou que a taxa diária de produção de H_2 utilizando amido como substrato aumentou significativamente.

3.7.4 Substrato

Uma grande variedade de materiais ricos em carboidratos, lipídios e/ou proteínas podem ser utilizados como substratos na produção de bioprodutos por via biológica. No entanto, conforme descrito por inúmeros estudos, os carboidratos constituem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo (GUO et al., 2010; WANG e WAN, 2009). Este fato fica evidenciado em um estudo realizado por Lay e colaboradores (2003), no qual foram utilizados substratos de diferentes composições químicas com a mesma cultura mista de micro-organismos. Os autores observaram que resíduos ricos em carboidratos possuem um potencial para produção de hidrogênio 20 vezes maior quando comparado aos resíduos ricos em lipídios e proteínas.

Disponibilidade, custo e biodegradabilidade constituem os principais critérios para seleção de substratos adequados para a produção de hidrogênio fermentativo (HAWKES et al., 2002). Carboidratos simples, como sacarose e glicose são facilmente biodegradáveis, por esse motivo, são utilizados como substratos modelo para produção do biohidrogênio. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de H_2 em grande

escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo (NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010; DAS e VEZIROGLU, 2008). É neste contexto que se destaca a utilização de materiais residuais como potenciais substratos para produção de bioprodutos como H_2 e ácidos orgânicos, pois é sabido que a produção de hidrogênio é acompanhada pela produção de ácidos.

O glicerol tem se destacado como fonte de carbono em processos fermentativos por não demandar pré-tratamento para sua utilização. Ao contrário da maioria dos resíduos celulósicos e alimentícios que não podem ser empregados diretamente na degradação biológica, devido às suas estruturas complexas, necessitando de tratamento prévio para viabilizar o seu uso. Dessa forma, o glicerol sobressai em relação a outras fontes de carbono, como um substrato promissor na produção biológica de hidrogênio e outros produtos de valor agregado (PARANHOS, 2016).

Estudos vêm sendo realizados no intuito de alcançar a maior eficiência de degradação do glicerol quando utilizado como substrato em processos fermentativos. Os estudos mostram que em uma faixa apropriada, aumentar a concentração do substrato pode aumentar a capacidade das bactérias em produzir hidrogênio. Em contrapartida, concentrações em níveis muito mais altos poderiam diminuir significativamente o hidrogênio e etanol, mas aumentar a produtividade de 1,3-propanodiol por exemplo (HU; WOOD, 2010; MOON et al., 2011). Salienta-se que existem certos desacordos sobre a concentração ótima de um dado substrato para produção de hidrogênio via fermentação, em virtude dos variados tipos de inóculos que podem ser testados. Por isso é essencial saber os microrganismos envolvidos ao comparar qualquer rendimento dos metabólitos gerados (WANG; WAN, 2009).

3.7.5 Grau de agitação

Os digestores convencionais devem possuir algum sistema de agitação por retorno de gás produzido, após compressa, por recirculação dos sólidos em suspensão em digestão do fundo para todo o digestor ou por agitação mecânica, pois caso contrário a velocidade do processo será bastante reduzida, visto que, não ocorrerá o contato suficiente entre as bactérias e a matéria orgânica e haverá zonas mortas, devido a sedimentação, ocasionando perda da capacidade útil do digestor. Há indícios que uma demasiada agitação no digestor favorece as bactérias acidogênicas podendo assim causar um desequilíbrio no processo (DE SOUZA, 1984).

3.7.6 Inóculo

Como a biodigestão compreende num processo complexo que exige a presença de diferentes espécies microbianas, faz-se necessário utilizar um inóculo apropriado, que contenha os microrganismos necessários para que o processo de degradação possa ser estabelecido. O inóculo não só proporciona um consórcio microbiano variado, como também macro e micronutrientes e capacidade de neutralização (YANG et al., 2015). A concentração de inóculo é importante para o processo e varia de acordo com o material utilizado para ativar a população microbiana. De fato, o tipo de inóculo afeta a população microbiana no processo, bem como a diferença na composição físico-química e na capacidade de produção de biogás (DE VRIEZE et al., 2015; SILVA, C. E. D. F.; ABUD, 2016)

A utilização de culturas puras tem sido largamente usada para produção de hidrogênio a partir de variados substratos, sendo a maioria dos estudos realizados em bateladas utilizando glicose como substrato. No entanto, é mais desejável produzir hidrogênio a partir de resíduos orgânicos usando sistema com reatores de alimentação contínua, pois torna-se mais viável às indústrias alcançar o objetivo de redução de resíduos e produção de energia em larga escala, com eficiência considerável (LI; FANG, 2007).

Entretanto, existem consórcios de bactérias em ambientes naturais que podem ser utilizados como inóculos para a produção de hidrogênio, por via anaeróbia. Inóculos mistos são de simples manuseio e controle, o que industrialmente se torna mais interessante, sobretudo do ponto de vista operacional, além de contar com uma maior opção de matéria-prima que pode ser empregada como fonte de substrato (SILVA, 2017).

A escolha dos microrganismos envolve o tipo de substrato e também do balanço econômico do processo de produção de H_2 . Devido às condições ambientais e a diversidade de substâncias no resíduo a ser utilizado, há grandes possibilidade de bactérias que consomem o H_2 estarem presentes em elevada concentração. Com isso, sugere-se que culturas mistas passem por um pré-tratamento por métodos como choque térmico, aeração, congelamento e descongelamento ou adição de ácido (WANG e WAN, 2008; NEVES, 2009).

Tem-se ainda a possibilidade de combinar culturas, as chamadas culturas bioaumentadas, normalmente empregadas visando a melhoria da eficiência dos processos microbiológicos, uma vez que os intermediários de uma via catabólica de uma cepa podem ser ainda degradados por outras cepas devido às interações sinérgicas entre os microrganismos ali associados, o que pode levar à degradação completa do substrato (BHATTACHARYA et al.,

2015). Embora sabe-se que também pode ocorrer a competição pelo substrato, o que implicaria na queda do rendimento de determinado metabólito de interesse (SILVA, 2017).

3.7.7 Modo operacional do reator

A maioria dos estudos relacionados à produção de H_2 por via fermentativa anaeróbia tem sido conduzida em batelada. Reatores em batelada possuem a vantagem de serem simples, flexíveis e facilmente operados. No entanto, operações em grande escala requerem processos de produção contínuos por razões práticas de armazenamento de resíduos e por considerações econômicas (GUO et al., 2010; WANG e WAN, 2009). No processo contínuo em escala laboratorial, o reator de tanque agitado contínuo (em inglês, continuously stirred tank reactor – CSTR) tem sido comumente utilizado (AROOJ et al., 2008). Outros tipos de reatores também têm sido utilizados, tais como o reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (CHANG e LIN, 2004), biorreator de leito empacotado (LEITE et al., 2008); reator de leito fixo (LI, ZHANG e FANG, 2006), biorreator de leito fixo e ascendente (PEIXOTO, 2008); reator batelada anaeróbio em série (CHEONG, HANSEN e STEVENS, 2007) entre outros.

3.8 Estratégias para a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos

As estratégias para assegurar uma efetiva produção de hidrogênio e ácidos orgânicos consistem em garantir que um sistema contenha, essencialmente, organismos produtores de hidrogênio, e aperfeiçoar as condições operacionais para assegurar as melhores produções de hidrogênio e ácidos orgânicos. Uma vez que a produção de hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos ocorre em uma fase intermediária da digestão anaeróbia, é necessário que o processo seja interrompido nessa fase para que os produtos gerados não sejam consumidos na etapa posterior da metanogênese. As diferenças fisiológicas entre as acidogênicas e metanogênicas representam a base fundamental para o desenvolvimento de estratégias para o acúmulo de hidrogênio e ácidos orgânicos (SHIDA, 2008).

Considerando a capacidade em produzir endósporos, as bactérias acidogênicas podem ser selecionadas a partir de fontes naturais como o solo (VAN GINKEL et al., 2001; IYER et al., 2004), de sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes (ZHANG et al., 2006; LIN et al., 2006) e de sistemas produtores de hidrogênio com uma população acidogênica já selecionada (FANG e LIU, 2002.).

Ainda, aliado à tecnologia de tratamento do inóculo, diversos autores operaram seus sistemas em condições de pH ácido para inibir a atividade metanogênica durante os experimentos (YU e FANG et al., 2001; LIU et al., 2002; YU et al., 2003).

Além disso, a produção fermentativa de hidrogênio e de ácidos orgânicos é um processo muito complexo e influenciado por muitos fatores, como inóculo, substrato, tipo de reator, nitrogênio, fosfato, íon metálico, temperatura e pH (WANG e WAN, 2009).

Logo, inibindo a etapa final do processo de digestão anaeróbia, somente a acidogênese ocorrerá para produzir os gases hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos.

3.9 Reatores anaeróbios em batelada

Uma variedade de configurações de biorreatores pode ser empregada para a produção de hidrogênio a partir de materiais orgânicos baratos, incluindo o glicerol bruto proveniente da indústria de biodiesel. Eles podem ser simples garrafas de soro de tamanhos diferentes, fermentadores em escala laboratorial, com agitação e controle de pH, reatores de fluxo ascendente, ou podem ser células bioeletroquímicas. No entanto, com base no potencial de produção de hidrogênio, uma configuração em particular não pode ser considerada superior às demais configurações. Observa-se que a maior parte dos experimentos é conduzida no modo de operação em batelada usando uma configuração simplificada com a utilização de frascos de soro (SARMA et al., 2012).

Reatores em batelada são usados em escala laboratorial na maioria dos estudos que tratam de fermentação na ausência de luz. Tal configuração possui a vantagem de ser mais simples, facilmente operado e flexível. Isto resultou na ampla utilização de reatores em batelada para a determinação do potencial de geração de biohidrogênio a partir de substratos orgânicos. No entanto, em um contexto industrial, por razões práticas de gestão de armazenamento de resíduos e de considerações de ordem econômica, os bioprocessos contínuos são recomendados (GUO et al., 2010; SÁ et al., 2014). Até o presente momento, nenhum reator de biohidrogênio em escala industrial foi configurado, mas espera-se que o design de biorreator e a configuração do sistema sejam semelhantes às usinas de biogás de metano: somente os parâmetros operacionais podem variar entre estas duas aplicações anaeróbias.

Tendo em vista a vasta experiência adquirida em unidades de biogás que tratam resíduos orgânicos agrícolas, especialmente na Alemanha, o reator mais provável para a produção de biohidrogênio seria um reator de tanque vertical, continuamente agitado com diferentes tipos de misturadores (GUO et al., 2010).

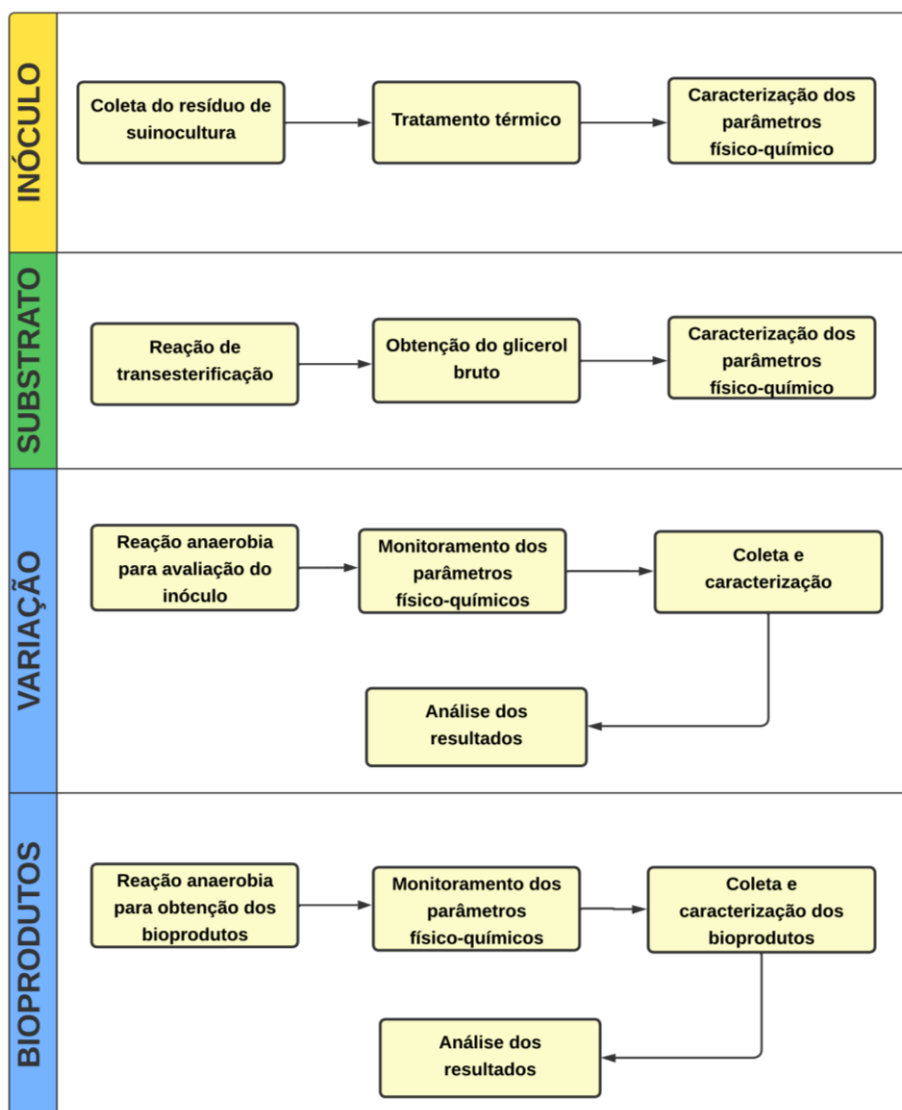
Em alguns estudos, verificou-se que a produção de hidrogênio em reatores em batelada apresentava maiores rendimentos de hidrogênio gerados do que os reatores em modo contínuo. Isto pode ser atribuído ao microambiente substancialmente diferente em um reator em batelada (variáveis no tempo e conseqüentemente concentrações elevadas de substrato na parte inicial do reator em batelada) que conduz a um fluxo metabólico diferente do que em microambiente com concentração reduzida de substrato de forma constante que acontece em reator de tanque agitado, em modo contínuo (NTAIKOU et al., 2010).

4 METODOLOGIA

A Figura 6 apresenta um fluxograma da metodologia utilizada durante a produção desse trabalho experimental.

A metodologia como se pode observar foi dividida em quatro partes, onde a primeira consistiu na coleta e caracterização do efluente de suinocultura (que será utilizado como inóculo), a segunda na produção do glicerol bruto em laboratório, a terceira se fez variações do efluente de suinocultura (inóculo) para se escolher o melhor inóculo a ser utilizado nas reações de fermentação anaeróbia e por último consistiu no acompanhamento e produção dos bioprodutos.

Figura 6 - Fluxograma das etapas do estudo realizado.

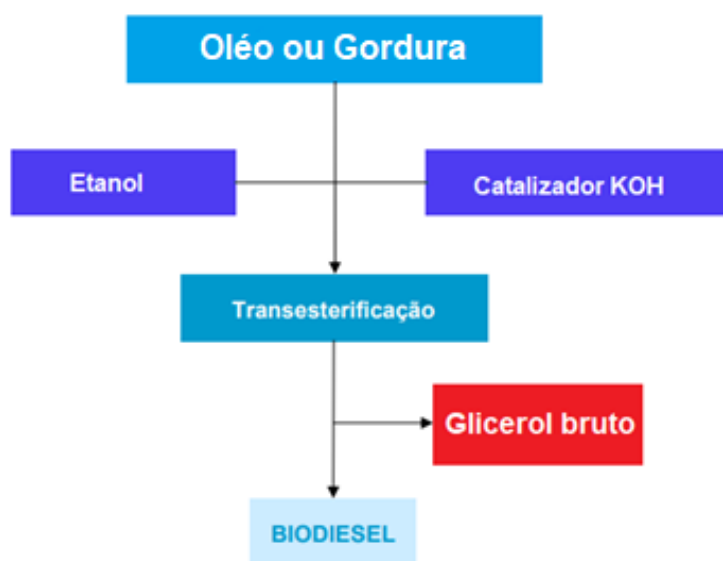


Com o intuito de produzir bioprodutos, baseado em Aguilar-Aguilar (2019), foi realizado ensaios em reatores de batelada operados em temperatura mesofílica, destinados à produção biológica de metabólitos de maior valor agregado utilizando glicerol bruto como fonte de carbono e efluente de suinocultura como inóculo.

4.1 Substrato: Produção de glicerol bruto

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) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), por meio de reação de transesterificação de óleo de fritura de soja (Figura 7), fornecido pelo restaurante universitário da UFAL.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de produção de biodiesel



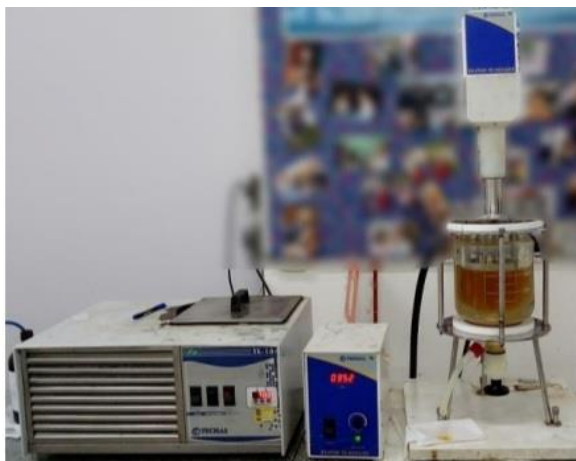
Fonte: Autor, 2024.

Para produção de glicerol bruto, como se trata de uma reação reversível, foi utilizado excesso de etanol para direcionar a reação no sentido da produção de biodiesel, assim, em cada reação o etanol foi colocado na proporção 7:1, etanol para óleo. O catalisador utilizado na reação foi hidróxido de potássio (KOH), com quantidade de 1,7% em relação à massa de óleo (SILVA, 2011).

Para as reações de transesterificação foram utilizados um reator do tipo CSTR de 1,5 L de capacidade total, utilizado no modo batelada, com agitador a 2000 rpm, e temperatura de 30

°C, conforme Figura 8. Para cada reação, o catalisador (KOH) foi previamente dissolvido no álcool (etanol) e o óleo, depois de pré-aquecido previamente no reator, recebeu a mistura de hidróxido de potássio e etanol, dando início à reação.

Figura 8 - Reator STR para produção do glicerol bruto.



Fonte: Pereyra, 2019.

Após 30 minutos de reação o glicerol foi separado da mistura miscível utilizando um funil de separação e um rotaevaporador, para remoção total do etanol, conforme Figura 9, e posteriormente realizada as análises de caracterização.

Figura 9 - Separação do biodiesel e glicerol bruto



Fonte: Pereyra, 2019.

Na figura 10 encontra-se o glicerol bruto que será utilizado nos ensaios de fermentação anaeróbia para obtenção dos bioprodutos.

Figura 10 - Glicerol bruto produzido do processo de transesterificação de óleo de fritura de soja.



Fonte: Autor, 2024.

Glicerol bruto proveniente do processo de transesterificação utilizando óleos de frituras precisam ser caracterizados pela variação significativa na quantidade de água, materiais sólidos, compostos polares e ácidos graxos livres (JORGE et al., 2005).

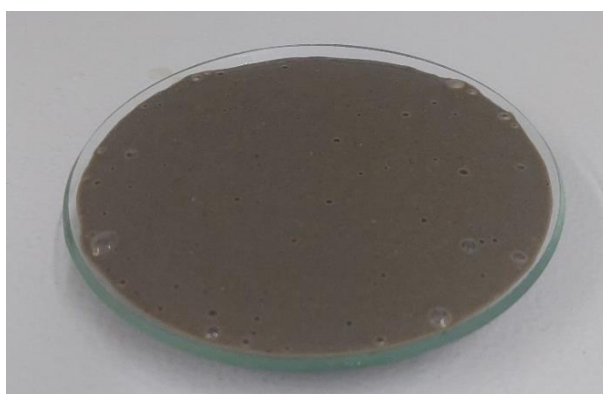
O índice de acidez indica a quantidade de ácidos graxos livres presentes em uma determinada amostra, sendo geralmente demonstrado como porcentagem em relação à massa de ácido oleico na amostra. Óleos com índice de acidez menores a 1% não necessitam de pré-tratamento. Os óleos com índices entre 1 e 5% 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).

4.2 Inóculo e pré-tratamento

No presente trabalho foi utilizado efluente de suinocultura, como inóculo, por ser um efluente agroindustrial e gerado em vários municípios do Estado de Alagoas. As amostras coletadas obtidas de uma propriedade rural de criação de suínos localizado no município de Mar Vermelho – AL. O mesmo foi acondicionado em recipientes (previamente lavados com água e álcool 70%), e armazenadas em freezer a -15°C até o uso.

O inóculo (Figura 11) utilizado no reator foi submetido a um tratamento térmico de 90 °C durante um período de 15 minutos e posterior esfriamento em banho de gelo até a temperatura de 25 °C, de modo a inibir o desenvolvimento de microrganismos produtores de metano, e selecionar as bactérias anaeróbias formadoras de esporos, tais como *Clostridium sp*, de acordo com recomendado por Maintinguer et al. (2008) adaptado de Kim et al. (2006). Este processo é amplamente utilizado para o tratamento de microflora mista quando se tem interesse em bactérias produtoras de hidrogênio (WONG et al., 2014; ZUMAR BUNDHOO et al., 2015).

Figura 11: Efluente de suinocultura: Inóculo

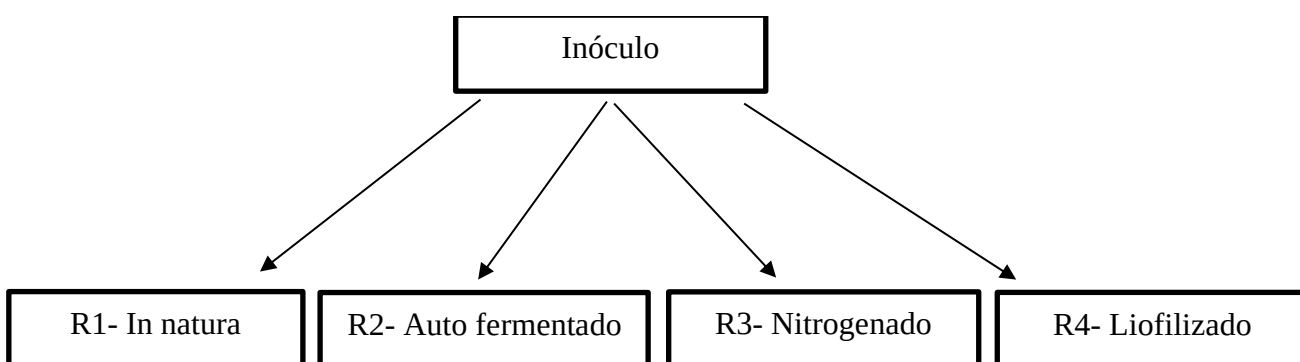


Fonte: Autor, 2024.

4.3 Ensaios em reatores anaeróbios em batelada: Escolha do inóculo (1º etapa)

A digestão anaeróbia do presente trabalho foi dividida em duas etapas, onde a primeira etapa foi realizada um estudo com quatro variações do inóculo do efluente de suinocultura (in natura, auto fermentado, nitrogenado e liofilizado), Figura 12, afim de escolher o melhor inóculo a ser utilizado na segunda etapa da digestão anaeróbia.

Figura 12 - Estudo da avaliação do inóculo. Esquema dos testes preliminares.



Fonte: Autor, 2024.

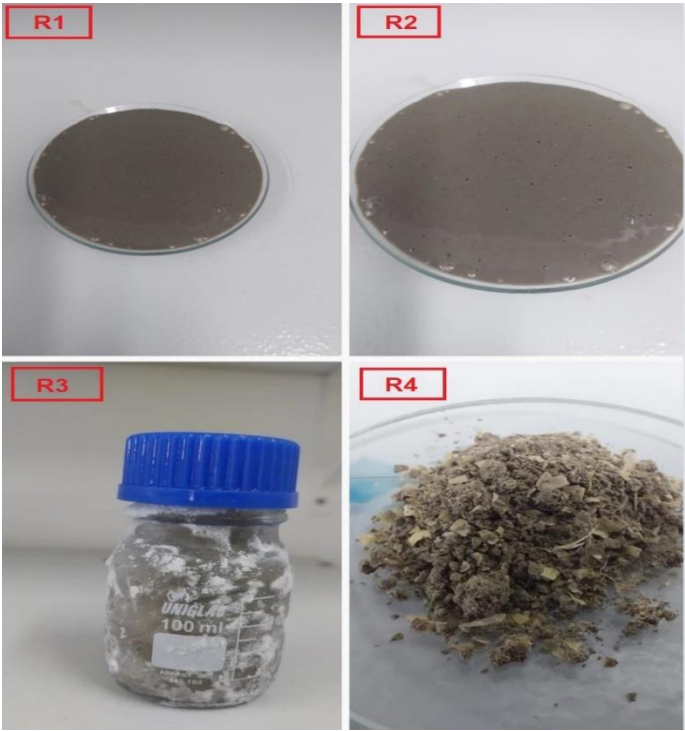
Tabela 4 - Descrição das variações do inóculo.

INÓCULO	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
In natura	Efluente cru, pré-tratado termicamente para inativar os microrganismos metanogênicos.	Rossi et al., 2011.
Auto fermentado	Para obtenção do inóculo pelo processo de fermentação natural (auto fermentação), o efluente pré-tratado termicamente, foi colocado em recipiente aberto, tipo béquer de 1 L, coberto por tela para preservação de insetos por um período de 100 h e exposto ao ambiente para crescimento microbiano.	Adaptado de Penteado, 2012.
Nitrogenado	Efluente pré-tratado termicamente, depois de ter atingindo a temperatura ambiente sofreu um congelamento instantâneo com N ₂ líquido.	Santos et al., 2020
Liofilizado	Preparado no liofilizador de bancada LS3000 Terroni, localizado no laboratório de análises farmacêuticas e alimentícias (LAFA) da Universidade Federal de Alagoas. O método consistiu no congelamento do efluente, pré-tratado termicamente, com N ₂ líquido e posterior sublimação, na câmara do aparelho, aplicando-se vácuo e fornecimento de calor.	Adaptado de Oliveira e Silva, 2018.

Fonte: Autor, 2024.

A Figura 13 mostra as quatro variações do inóculo de efluente de suinocultura após seus respectivos pré-tratamentos.

Figura 13 - Variações do inóculo de efluente de suinocultura: R1 (in natura); R2 (auto fermentado); R3 (nitrogenado); R4 (liofilizado).



Fonte: Autor, 2024.

A escolha foi feita de acordo com o inóculo que teve maior rendimento de hidrogênio gasoso, pois se sabe que as bactérias acidogênicas, produtoras ácidos orgânicos, produzem ácidos orgânicos de acordo com os níveis de hidrogênio no meio (BUNDHOO, 2017; KHAN et al., 2018; LI et al., 2018).

Após a fase de pré-tratamento, foram realizados experimentos em batelada montados em triplicata (com as quatro variações do efluente de suinocultura), desenvolvidos em frascos de capacidade útil de 250 mL com meio reacional de 100 mL. A Figura 14 apresenta a ilustração do reator em batelada utilizado no experimento.

Em todos os tratamentos manteve-se 90% v/v solução de glicerol bruto, de concentração fixa de 50 g/L, conforme estudado por De Oliveira Nobre (2015) e Marques (2021), e 10% de volume experimental do inóculo. No reator 1 (inóculo R1), no reator 2 (inóculo R2) e no reator 3 (inóculo R3) foram adicionados 90 mL de glicerol bruto e 10 mL do inóculo respectivo. No reator 4, 1,32g de inóculo R4 (calculado a partir dos sólidos totais voláteis) foi dissolvido no meio 90% v/v solução de glicerol bruto, concentração fixa de 50 g/L e completado com água destilada para um volume total reacional de 100 mL.

Todos os experimentos foram preparados com a estratégia de inibição da metanogênese adotada e com substituição do ar atmosférico presente no *headspace* dos frascos através do borbulhamento de nitrogênio gasoso (N₂) para estabelecer a anaerobiose do processo fermentativo (CHANDOLIAS; PARDAEV; TAHERZADEH, 2016).

Figura 14 - Ilustração do reator em batelada para averiguação do melhor inóculo.



Fonte: Autor, 2024.

O experimento foi desenvolvido durante 20 dias, período que se alcançou a estabilidade do sistema fermentativo, em condições mesofílicas, com a temperatura de 30 ± 1 °C mantida

em uma câmara incubadora refrigerada sem agitação orbital (*shaker*), modelo MA380. O pH inicial reacional foi ajustado para 5,0 mediante a adição de HCl 1M.

Conforme Lettinga et al., (2001) na faixa mesofílica a digestão anaeróbia se desenvolve bem em temperaturas desde 30 °C até 40 °C. O controle inicial do pH foi realizado, de modo a viabilizar a geração de bioprodutos de interesse, uma vez que a acumulação de ácidos intermediários provenientes do metabolismo implicará na acidificação e consequente queda do pH, inviabilizando o processo fermentativo (FANG; LIU, 2002; WANG et al., 2005; MU et al., 2006 e SÁ et al., 2014). Por razões energéticas, uma concentração elevada de hidrogênio impede a acetogênese e, por consequência, ocorre o acúmulo de ácidos orgânicos (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

As caracterizações dos produtos formados foram realizadas conforme mostra a Tabela 5. Em cada fase experimental foram feitas coletas de amostras dos reatores anaeróbios afins de serem realizadas as devidas análises físico-químicas e cromatográficas. Antes de cada análise as amostras foram filtradas em filtros de microfibras de vidro.

Tabela 5 - Monitoramento do reator em batelada para averiguação do inóculo.

ANÁLISE	PERIODICIDADE	METODOLOGIA
Temperatura	Diário	Termômetro
pH	Inicial e Final	APHA (2005)
DQO	Inicial e Final	APHA (2005)
Sólidos totais (ST)	Inicial e Final	APHA (2005)
Sólidos fixos (SF)	Inicial e Final	APHA (2005)
Sólidos voláteis (SV)	Inicial e Final	APHA (2005)
Ácidos orgânicos e álcoois	Inicial e Final	MAINTINGUER et al. (2008)
Produção de H ₂	Diário	APHA (2005)

Fonte: Autor, 2024.

4.4 Ensaio em reatores anaeróbios em batelada: Produção de bioprodutos (2ª etapa)

A segunda etapa consistiu na utilização do inóculo que teve maior produção de hidrogênio, parâmetro observado para produção de ácidos orgânicos (AOV). Além disso a segunda etapa foi observada o acompanhamento da produção dos AOV a cada dois dias, durante 20 dias, período de estabilidade do processo.

Foram montados (em triplicata) reatores anaeróbios em batelada de 500 mL (Figura 15) obedecendo o meio reacional de 90% v/v solução substrato e 10% de volume experimental do inóculo. Foi dissolvido no meio experimental de 250 mL, 3,29 g do inóculo liofilizado

(calculado a partir dos sólidos totais voláteis) com a estratégia de inibição da metanogênese adotada e com substituição do ar atmosférico presente no *headspace* dos frascos através do borbulhamento de nitrogênio gasoso (N₂) para estabelecer a anaerobiose do processo fermentativo (CHANDOLIAS; PARDAEV; TAHERZADEH, 2016).

Figura 15 - Ilustração do reator em batelada para obtenção dos bioprodutos.



Fonte: Autor, 2024.

O experimento foi desenvolvido em condições mesofílicas, com a temperatura de 30 ± 1 °C mantida em uma câmara incubadora refrigerada sem agitação orbital (*shaker*), modelo MA380. O pH inicial reacional foi ajustado para 5,0 mediante a adição de HCl 1M.

As caracterizações dos produtos formados foram realizadas periodicamente conforme mostra a Tabela 6. Em cada fase experimental foram feitas coletas de amostras dos reatores anaeróbios afins de serem realizadas as devidas análises físico-químicas e cromatográficas. Antes de cada análise as amostras serão filtradas.

Tabela 6 - Monitoramento do reator em batelada para obtenção de bioprodutos.

ANÁLISE	PERIODICIDADE	METODOLOGIA
Temperatura	Diário	Termômetro
pH	Inicial e Final	APHA (2005)
DQO	Inicial e Final	APHA (2005)
Sólidos totais (ST)	Inicial e Final	APHA (2005)
Sólidos fixos (ST)	Inicial e Final	APHA (2005)
Sólidos voláteis (SV)	Inicial e Final	APHA (2005)
Ácidos orgânicos e álcoois	2x por dia	MAINTINGUER et al. (2008)
Produção de H ₂	Diário	APHA (2005)

Fonte: Autor, 2024.

4.5 Ensaios de caracterização do substrato, do inóculo e dos reatores

4.5.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas do inóculo e do substrato utilizado foram: temperatura, pH, demanda química de oxigênio (DQO) e análise de sólidos (totais, fixos e voláteis). Todas as análises foram realizadas de acordo com APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005).

4.5.2 Análise de quantificação do hidrogênio

As análises para determinar e quantificar o gás H_2 produzido nos reatores foram realizadas por cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia desenvolvida por Maintinguer et al. (2008) e replicada por vários autores (CHAVES, 2018; ANDRADE, 2017; VIANA, 2016; AHMAD, 2016).

Utilizou-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.

4.5.3 Análises de metabólitos solúveis pelo método de headspace

A determinação dos metabólitos solúveis foi executada pelo método de extração por *headspace* de acordo com metodologia adaptada de Adorno et al. (2014) e Chaves (2018), com o uso do amostrador automático HS-20 acoplado ao cromatógrafo gasoso GC 2010, ambos da marca Shimadzu® e processado no software LabSolutions.

O cromatógrafo gasoso foi o mesmo utilizado na análise de composição dos metabólitos solúveis, havendo apenas a troca da sua coluna CarboxenTM 1010 PLOT por uma coluna SUPELCOWAXTM 10, também com capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25µm), com hidrogênio como gás de arraste e detector de ionização de chama (FID). As amostras líquidas de efluente foram preparadas pelo efeito salting-out, em tubos de 10 mL com tampa rosqueável e septo de silicone branco e azul, com a adição de 1 g de NaCl, 2 mL de amostra, 70 µL de solução de isobutanol a 1 g/L, 100 µL de ácido crotônico a 700 mg/L e 200 µL de ácido sulfúrico 2 M, de acordo com Adorno et al. (2014).

A quantificação foi realizada utilizando o cromatógrafo GC 2010 - Adaptado de Adorno et al. (2014): com a seguinte configuração:

- Rampa de temperatura: 35 °C (0'), 2 °C/min 38 °C (0'), 10 °C/min 75 °C (0'), 35 °C/min 120 °C (1'), 10 °C/min 170 °C 2 °C/min;
- Temperaturas do injetor, do detector (FID) e da coluna: 250, 280 e 35 °C, respectivamente;
- Razão de Split: 16,3;
- Fluxo do gás de arraste (H₂), do make-up ou gás auxiliar (N₂) e do gás de chama (ar sintético): 30, 30 e 300 mL/min, respectivamente;
- Velocidade linear constante: 41,8 cm/s;
- Fluxo da coluna: 1,56 mL/min.dia;
- Tempo total de análise: 14,49 min.

➤ Para o amostrador automático HS-20 –Baseado em Frink e Armstrong (2017):

- Pressão do gás de pressurização (Argônio): 100 kPa;
- Nível de agitação: 2;
- Temperaturas do forno, da linha de amostra e da linha de transferência: 105,3; 150 e 118 °C, respectivamente;
- Tempos de equilíbrio, de pressurização e de equilíbrio da pressão: 5; 0,5 e 0,10 minutos, respectivamente;
- Tempos de carregamento, de equilíbrio do carregamento e de injeção: 0,5; 0,10 e 0,5 minutos, respectivamente;
- Tempo de ciclo do GC: 14,99 minutos.

A partir destas condições, foi possível avaliar a produção de acetona, metanol, etanol, n-butanol e de seis ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caproico). A análise de metabólitos também possibilitou observar a principal rota seguida pelos microrganismos presentes no reator para produzir hidrogênio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, serão apresentados os resultados dos parâmetros analisados durante as duas etapas de operação dos reatores em batelada que foram utilizados nesta pesquisa. São descritas as caracterizações do substrato, do inóculo e dados de monitoramento do reator como temperatura e pH.

Posteriormente são descritos os resultados referentes a remoção de DQO, concentração de sólidos, produção volumétrica do gás hidrogênio e concentrações dos metabólicos solúveis produzidos durante a operação dos reatores.

5. Caracterização do substrato e do inóculo

Na Tabela 7 encontram-se os resultados da caracterização físico-química do glicerol bruto e do efluente de suinocultura.

Tabela 7 - Características físico química do substrato e do inóculo.

PARÂMETROS	GLICEROL BRUTO	EFLUENTE DE SUINOCULTURA
pH	9,99 ± 0,19	6,08 ± 0,9
ST (mg. L ⁻¹)	604.436,00 ± 8.536	177.730,00 ± 2.766
SV (mg. L ⁻¹)	550.780,00 ± 7.666	131.733,00 ± 2.814
SF (mg. L ⁻¹)	53.656,00 ± 2.579	45.997,00 ± 48,00
DQO (mg. L ⁻¹)	1.903,215 ± 6.757	138.367,00 ± 617,00
Alcalinidade (mg. L ⁻¹)	23.195,190 ± 216,07	-
Umidade (%)	69% ± 0,014	-
Viscosidade (mm ²)	400,32 ± 17,77	-

Fonte: Autor, 2024.

O pH alcalino do glicerol bruto o remete ao processo que lhe deu origem, subproduto da transesterificação de óleo vegetal com etanol por catálise homogênea com hidróxido de potássio, base forte, que resultou em pH extremamente alcalino (9,99 pH). Em se tratando do efluente de suinocultura foi observado que o pH se encontrava no limite inferior requerido para o desenvolvimento das bactérias anaeróbias metanogênicas (6,08 pH). Segundo Kondusamy et al. (2014) as bactérias anaeróbias metanogênicas se desenvolvem bem em uma faixa de pH de 6,5 a 7,5, pois valores fora desta faixa inibem ou dificultam seu desenvolvimento, já que as arqueobacterias são sensíveis às mudanças de pH. O valor de pH é um importante indicador para avaliar a estabilidade dos sistemas de digestão anaeróbia, pois afeta os microrganismos acidogênicos e metanogênicos (GLANPRACHA; ANNACHHATRE, 2016; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014).

A DQO do glicerol bruto produzido foi bastante significativa, de 1.571,066 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. O valor de sólidos voláteis no glicerol bruto foi cerca de 95% superior ao contido encontrado nos trabalhos de Angonese (2006) – 25.486,00 mg. L⁻¹ e bastante superior ao relatado por Lovatel (2016) – 2.901,00 mg. L⁻¹. O valor de SV/ST do efluente de suinocultura e do glicerol bruto foram de aproximadamente 74% e 91% respectivamente, medida indireta de conteúdo de material orgânico que poderá ser convertida.

5.2 Digestão anaeróbia

5.2.1 Análise da eficiência da digestão anaeróbia para os diferentes inóculos: Escolha do inóculo (1º etapa)

5.2.1.1 Caracterização físico-química dos ensaios de digestão anaeróbia e eficiências de remoção em termos de DQO e SVT

A Tabela 8 mostra a caracterização inicial e final das misturas do efluente de suinocultura investigadas, bem como as eficiências de remoção em termos de DQO e SVT.

Tabela 8 - Características iniciais e finais e eficiências de remoção nos reatores estudados da Etapa 1.

PARÂMETROS	INÓCULO			
	In natura	Auto fermentado	Nitrogenado	Liofilizado
DQO _{Inicial} (mg/L)	35.985,60 ± 356,21	36.237,48 ± 534,31	38.000,64 ± 890,42	36.993,12 ± 712,42
DQO _{Final} (mg/L)	24.902,88 ± 712,42	26.414,16 ± 534,00	22.586,1 ± 890,00	17.850,24 ± 178,00
E _{DQO} (%)	31% ± 0,02	27% ± 0,01	41% ± 0,01	52% ± 0,01
STV _{Inicial} (mg/L)	29.960,00 ± 1.627	28.360,00 ± 1.591	22.980,00 ± 1.460	17.680,00 ± 1.322
STV _{Final} (mg/L)	24.616,00 ± 2.814	23.068,00 ± 506,00	17.812,00 ± 2.386	11.612,00 ± 1.879
E _{STV} (%)	20% ± 0,09	19% ± 0,02	22% ± 0,11	34% ± 0,07
pH _{final}	4,92 ± 0,03	4,94 ± 0,11	4,54 ± 0,07	4,18 ± 006
DQO_{inicial}, DQO_{final} e E_{DQO} – Concentração de DQO inicial e final e eficiência de remoção; SVT_{inicial}, SVT_{final} e E_{SVT} – Concentração de sólidos voláteis totais inicial e final e eficiência de remoção.				

Fonte: Autor, 2024.

O pH inicial, sem ajustes, dos sistemas de digestão anaeróbia resultante da combinação do substrato, glicerol bruto e efluente de suinocultura (in natura, auto fermentado, nitrogenado e liofilizado) apesar de diferentes, quando analisados individualmente, ao se misturarem,

apresentaram os resultados 8,2; 7,63; 9,14 e 8,1 respectivamente. Como estratégia para produção de ácidos orgânicos e hidrogênio o pH dos reatores foi ajustado para 5,0 utilizando-se HCl 1M. No final do experimento foi observado que houve uma diminuição nos pH dos reatores tendo uma maior diminuição nos reatores contendo o inóculo liofilizado e nitrogenado. Essa diminuição de pH pode inferir, que a redução observada é devido a produção de H_2 acompanhada da formação de ácidos orgânicos voláteis (AOV). (BUNDHOO, 2017; KHAN et al., 2018; LI et al., 2018).

A eficiência dos reatores no tratamento de efluentes está diretamente relacionada à capacidade de reduzir a carga orgânica presente no substrato. No caso dos reatores contendo os inóculos liofilizado e nitrogenado, que apresentaram as maiores eficiências de remoção de DQO (52% e 41%, respectivamente), a redução da carga orgânica pode ser explicada pela maior atividade microbiana preservada após os processos de liofilização e tratamento com nitrogênio. Estudos indicam que o pré-tratamento térmico e a liofilização dos inóculos podem aumentar a eficiência da degradação da matéria orgânica ao promover a seleção de microrganismos mais resistentes e ativos (WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

Além disso, a remoção de sólidos voláteis totais (SVT) também foi mais eficiente nos reatores com inóculos liofilizados (34%) e nitrogenados (22%), comparados aos reatores com inóculos in natura e auto fermentado. De acordo com Campos et al. (2013), o tratamento com inóculos previamente selecionados pode acelerar a decomposição da matéria orgânica e otimizar a produção de biogás. Estudos de Cai et al. (2015) corroboram esses achados, indicando que microrganismos selecionados e cultivados sob condições controladas aumentam a eficiência da conversão de compostos orgânicos em biogás, além de favorecer a redução da carga poluidora do efluente tratado.

A redução da carga orgânica em sistemas anaeróbios também depende da remoção eficiente dos microrganismos consumidores de hidrogênio e metanogênicos, que competem com as bactérias produtoras de hidrogênio, conforme demonstrado por Li et al. (2007). O uso de pré-tratamentos como calor, ácidos ou congelamento instantâneo pode inibir esses competidores, resultando em uma fermentação mais eficiente e na redução da carga orgânica (SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

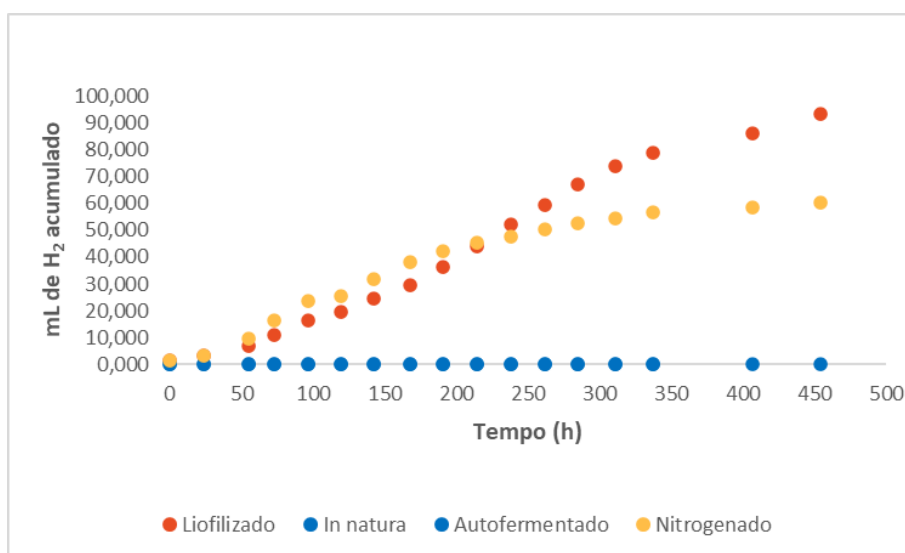
5.2.1.2 Produção de hidrogênio

A produção de hidrogênio foi acompanhada, no período de 20 dias, por meio do cromatógrafo gasoso de alta resolução, da marca Shimadzu®, modelo GC 2010, munido de detector

de condutividade térmica (TCD) até a estabilidade ser atingida nos reatores anaeróbios em batelada contendo o efluente de suinocultura, inóculo, e o glicerol 50 g/L, substrato.

Na Figura 16 encontram-se ilustradas as curvas de progresso da produção de H_2 acumulado, para cada variação do inóculo.

Figura 16 - Produção de hidrogênio acumulado das quatro variações do inóculo.



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados encontrados podem indicar que o inóculo afetou significativamente a produção de hidrogênio. No reator contendo o inóculo liofilizado foi observado uma maior produção acumulada de H_2 (93,068 mL de H_2) em detrimento dos inóculos nitrogenado (60,341 mL de H_2). Nos inóculos in natura e auto fermentado não houve produção de hidrogênio. Isso pode ocorrer devido à presença de microrganismos consumidores de hidrogênio produzido durante o processo fermentativo, impedindo sua acumulação significativa (XAVIER; LUCAS JÚNIOR, 2010; OH, VAN GINKEL E LOGAN, 2003).

Considerando a redução da carga orgânica (DQO) após a digestão anaeróbia foi possível notar que nos ensaios onde houve a produção de maior volume de biogás (liofilizado e nitrogenado) ocorreu também, os maiores valores de redução percentual da DQO, no entanto, os ensaios com menor redução de carga orgânica não apresentaram produção de biogás (in natura e auto fermentado) muito provavelmente devido a presença de bactérias consumidoras de H_2 .

O inóculo liofilizado se sobressaiu em relação a todos os inóculos (in natura, auto fermentado e inclusive o nitrogenado) possivelmente devido o processo de liofilização, pois tal

processo pode manter a viabilidade, estabilidade genética e até potencializar suas características (DE OLIVEIRA; DE SOUSA, 2012; FELIPE, 2019).

Os inóculo in natura e auto fermentado mesmo recebendo o tratamento térmico, para inibição de microrganismos metanogênicos, não foi bastante para eliminar os microrganismos consumidores de H_2 , pois segundo OH, Van Ginkel e Logan (2003) eliminar microrganismos metanogênicos pode não ser suficiente para evitar o consumo de H_2 , uma vez que as algumas bactérias homoacetogênicas são formadoras de esporos, podendo reesporular e consumir o H_2 .

Possivelmente nos inóculos (liofilizado e nitrogenado) os microrganismos consumidores de H_2 foram sensíveis ao mecanismo de congelamento com N_2 líquido, produzindo efeito inibidor ou letal. Diferentemente do que ocorreu com os microrganismos produtores de H_2 que possivelmente teve seu poder de crescimento, esporulação e germinação aumentado. Estudos feitos por De Oliveira e De Souza (2012) mostram que o congelamento com N_2 líquido apresentam comportamentos diferenciado nos microrganismos podendo ocorrer redução, aumento ou não germinação.

Além disso estudos feitos por Campos (2004) mostrou que o efeito crioprotetor de glicerol pode desempenhar um papel muito importante na crioproteção dos microrganismos, aumentando seu crescimento e esporulação. De Brum (2001) também mostra em seus estudos que a germinação de microrganismos é afetada pela luminosidade, temperatura, criopreservação, por crioprotetores, período de armazenamento, esterilização do material, tipo de gelo: rápido ou lento.

5.2.1.3 Produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs)

Durante a acidogênese, vários metabólitos foram produzidos junto com o hidrogênio, em diferentes concentrações. A Tabela 9 são expostas as concentrações médias em mmol/L dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores com seus respectivos inóculos. Nos reatores pode-se encontrar a presença de acetona, metanol, etanol, n-butanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido valérico e ácido caproico, com o etanol e o ácido acético em maiores quantidades quando se utilizou os inóculos in natura, auto fermentado e nitrogenado e ácido butírico quando se utilizou o inóculo liofilizado.

Tabela 9 - Concentrações em mmol/L dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores (etapa1).

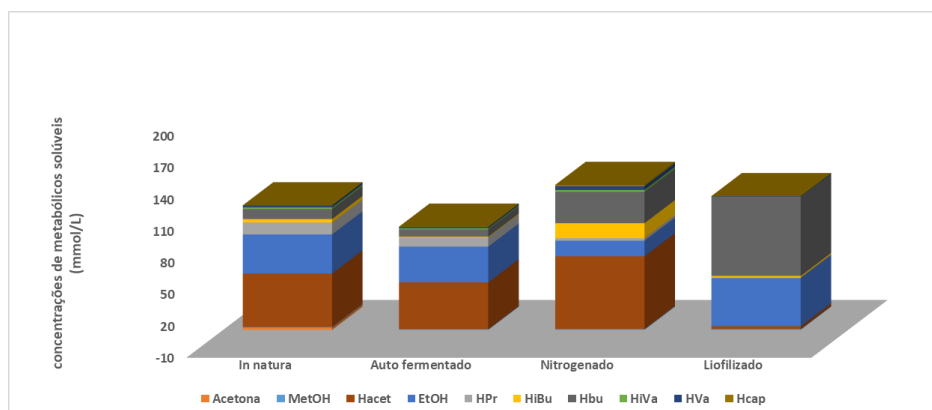
METABÓLICOS	INÓCULO			
	In natura	Auto fermentado	Nitrogenado	Liofilizado
Acetona (mmol/L)	2,09 ± 0,023	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Metanol (mmol/L)	0,53 ± 0,005	0,54 ± 0,044	0,67 ± 0,11	0,62 ± 0,057
Etanol (mmol/L)	36,93 ± 1,78	33,78 ± 0,54	14,75 ± 2,55	45,52 ± 3,37
n-butanol (mmol/L)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,12 ± 0,249	0,85 ± 0,589
Ácido acético (mmol/L)	50,71 ± 6,67	44,41 ± 3,03	68,90 ± 12,06	2,85 ± 0,55
Ácido propiônico (mmol/L)	11,22 ± 2,05	8,67 ± 0,35	2,42 ± 0,93	0,59 ± 0,092
Ácido isobutírico (mmol/L)	3,32 ± 2,88	0,70 ± 0,022	14,16 ± 2,89	1,43 ± 1,55
Ácido butírico (mmol/L)	9,49 ± 2,30	6,94 ± 0,422	29,65 ± 0,94	74,42 ± 4,73
Ácido isovalérico (mmol/L)	1,47 ± 0,28	0,96 ± 0,011	1,76 ± 0,312	0,21 ± 0,060
Ácido valérico (mmol/L)	1,96 ± 0,339	1,34 ± 0,065	3,60 ± 0,99	0,68 ± 0,066
Ácido caproico (mmol/L)	0,11 ± 0,004	0,28 ± 0,018	1,24 ± 0,41	0,23 ± 0,20

Fonte: Autor, 2024.

As concentrações de ácidos orgânicos (AOV) e dos metabólitos solúveis foram influenciados significativamente pelas mudanças do inóculo. A produção de metabólitos Solúveis Totais (MST) foi de 117,84; 97,62; 138,28 e 127,41 mmol/L, bem como uma produção de Ácidos Orgânicos Totais (TOA) de 80,90; 6384; 122,40 e 81,04 mmol/L para os inóculos in natura, auto fermentado, nitrogenado e liofilizado, respectivamente.

De acordo a Figura 17, o inóculo, além de influenciar na produção de gás hidrogênio, também afetou a distribuição dos Metabolitos Solúveis Totais produzidos (MST), bem como na produção de Ácidos Orgânicos Totais (TOA).

Figura 17 - Concentração de metabólitos solúveis (mmol/L).

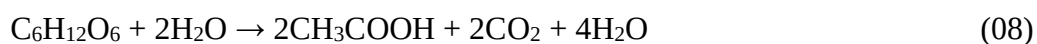


Fonte: Autor, 2024.

A menor produção de TOA foi observada no reator que utilizou o inóculo auto fermentado (97,62 mmol/L) e alcançou o ápice com o inóculo nitrogenado (138,28 mmol/L), isso provavelmente estar relacionado a menor e maior produção de H₂ nos reatores, respectivamente.

Obteve-se uma menor produção de ácidos orgânicos tanto no reator contendo os inóculos in natura quanto auto fermentado e quando se teve uma maior produção de hidrogênio, obteve-se também um aumento substancial na quantidade de ácidos orgânicos tanto para o inóculo nitrogenado quanto liofilizado. Chaves et al. (2021) cita que geralmente, a formação de hidrogênio é favorecida pela produção dos ácidos acético (4 mol-H₂/mol-glicose) e butírico (2 mol-H₂/mol-glicose), enquanto o consumo é realizado pelos microrganismos produtores de ácido propiônico, isso possivelmente pode ter contribuído para não produção de hidrogênio nos reatores contendo os inóculos in natura e auto fermentado, pois ambos foram que tiveram maior rendimento deste ácido, conforme Tabela 9. Sugere-se também que o inóculo liofilizado foi mais seletivo para produção de (AOV) do que o inóculo nitrogenado, mesmo tendo apresentado maior rendimento.

A presença do ácido acético em maior concentração nos reatores pode estar relacionada com a produção de hidrogênio. De acordo com Chaves (2018) quando este ácido é apenas um subproduto da fermentação na ausência de luz, resulta em um rendimento de hidrogênio máximo de 4 molH₂.mol⁻¹(Eq. 12), mas nem sempre a presença do mesmo está ligada a alta concentração de hidrogênio, isto porque, bactérias homoacetogênicas que provavelmente resistiram ao tratamento térmico do inóculo, podem ter utilizado H₂ para produzir ácido acético (Eq. 13).



A alta produção de etanol indica uma fermentação do tipo etanoica nos reatores in natura e auto fermentado, o que também pode explicar a possível não produção de hidrogênio nesses reatores, pois de acordo com Marques (2018) o etanol pode não ser desejável no reator, porque esta rota pode consumir substrato do meio e não produzir hidrogênio. Diferentemente do que ocorreu com os ensaios contendo os inóculos nitrogenado e liofilizado que os reatores produziram principalmente ácido acético (rota do acetato) e ácido butírico (rota do butirato), respectivamente que são os principais metabólitos ligado à alta produtividade de hidrogênio.

Mais especificamente, nos estudos de Li et al. (2007), Guo et al. (2008), Han et al. (2010), Chang et al. (2011), Han et al. (2012a), Han et al. (2012b), Li et al. (2013) e Zhu et al. (2013), o etanol e o ácido acético chegaram a representar, após estabilização, 70%, 89,1%, 89%, 80,7%, 82%, 89,3%, 71,5% e 73% dos metabólitos solúveis totais produzidos, respectivamente. Neste trabalho, essa porcentagem foi de 74,3% (in natura), 80% (auto fermentado), 60% (nitrogenado) e 38% (liofilizado). Os autores citados observaram que a fermentação do tipo etanol ocorre em pHs de efluentes bastante ácidos, geralmente entre 4 e 4,5; nesta pesquisa os pHs dos efluentes ficaram entre 4,18 e 4,94.

5.2.2 Análise da eficiência da digestão anaeróbia para o inóculo liofilizado: Produção de bioprodutos (2º etapa)

5.2.2.1 Caracterização físico-química dos ensaios de digestão anaeróbia e eficiências de remoção em termos de DQO e SVT

A Tabela 10 mostra a caracterização inicial e final da fermentação anaeróbia com o inóculo liofilizado (inóculo escolhido devido ter tido um maior rendimento na produção de hidrogênio) bem como a eficiência de remoção em termos de DQO e SVT.

Tabela 10 - Características iniciais e finais e eficiências de remoção no reator contendo o inóculo liofilizado.

Parâmetros	Liofilizado
DQO _{Inicial} (g/L)	48.3227,72 ± 356.21
DQO _{Final} (g/L)	21.880,32 ± 178.12
E _{DQO} (%)	55% ± 0,01
STV _{Inicial} (g/L)	22.472,00 ± 1.539
STV _{Final} (g/L)	15.980,00 ± 2.393
E _{STV} (%)	29% ± 0,05
pH _{final}	4,05 ± 0,19
DQO _{inicial} , DQO _{final} e E _{DQO} – Concentração de DQO inicial e final e eficiência de remoção; SVT _{inicial} , SVT _{final} e E _{SVT} – Concentração de sólidos voláteis totais inicial e final e eficiência de remoção	

Fonte: Autor, 2024.

O pH dos sistemas de digestão anaeróbia resultante da combinação do substrato (glicerol bruto) e efluente de suinocultura liofilizado apesar de diferente, quando analisados individualmente, ao se misturarem, apresentou o resultado de 8,2. O pH do reator foi ajustado para 5,0 utilizando -se HCl 1M. No final do experimento foi observado que houve uma

diminuição no pH para 4,05. Essa diminuição de pH pode inferir, que a redução observada é devido a produção de H_2 acompanhada da formação de ácidos orgânicos voláteis (AOV). (BUNDHOO, 2017; KHAN et al., 2018; LI et al., 2018).

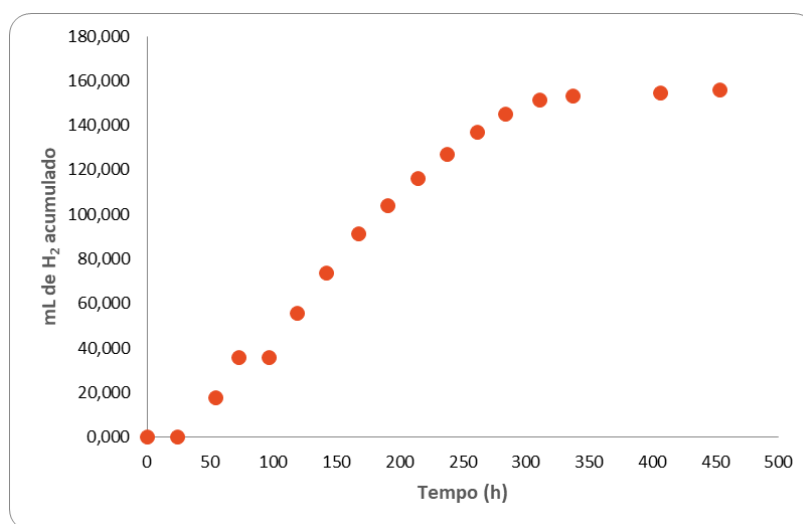
A redução da carga orgânica (DQO) após a digestão anaeróbica teve uma eficiência de remoção de 55%. Autores como Cremonez et al. (2015), que utilizaram águas residuárias de suinocultura e vinhaça, obtiveram melhor eficiência de remoção de 68,40%. Em relação ao SVT a digestão anaeróbia teve uma eficiência de 29%.

5.2.2.2 Produção de hidrogênio

A produção de hidrogênio também foi acompanhada, no período de 20 dias, por meio do cromatógrafo gasoso de alta resolução, da marca Shimadzu®, modelo GC 2010, munido de detector de condutividade térmica (TCD) até a estabilidade ser atingida nos reatores anaeróbios em batelada contendo o efluente de suinocultura, inóculo, e o glicerol bruto 50 g/L, substrato.

Na Figura 18 encontram-se ilustrada a curva de progresso da produção de biogás por mL de H_2 acumulado.

Figura 18 - Produção de hidrogênio acumulado do inóculo liofilizado.



Fonte: Autor, 2024.

O rendimento de biogás observado no ensaio contendo o inóculo liofilizado (2° etapa) foi de 155,814 mL de H_2 . O valor do hidrogênio acumulado da 2° etapa foi maior em relação ao inóculo liofilizado da 1° etapa devido o mesmo ter um volume reacional maior, de inóculo e substrato. Possivelmente nessa 2° etapa do experimento, como aconteceu na 1° etapa, os microrganismos consumidores de H_2 foram sensíveis ao mecanismo de congelamento com N_2

líquido, produzindo efeito inibidor ou letal, além de ter tido um possível aumento do poder de crescimento, esporulação e germinação dos microrganismos produtores de H_2 , conforme os autores De Oliveira; De Souza (2012) e Felipe (2019) o processo de liofilização pode manter a viabilidade, estabilidade genética e até potencialização de suas características.

Em relação à redução da carga orgânica (DQO) após a digestão anaeróbica foi possível notar que com o aumento da produção de volume de biogás ocorreu também uma maior redução do percentual da DQO, 55%.

5.2.2.3 Produção de ácidos orgânicos Voláteis (AOVs)

A quantificação dos ácidos orgânicos voláteis e álcoois no reator, é importante para verificação as rotas metabólicas adotadas pelas comunidades microbianas. Estas rotas, podem ser benéficas quando produzem hidrogênio ou malélicas quando consomem hidrogênio ou substrato do meio e assim, interfere diretamente no rendimento de hidrogênio. Além disso, alguns desse metabólitos gerados podem ter papel inibitório ou tóxico para os microrganismos produtores de H_2 (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008; OTTAVIANO, 2014).

Na Tabela 11 são expostas as concentrações em mmol/L dos metabólitos solúveis produzidos no reator contendo o inóculo liofilizado. Esse inóculo foi escolhido para 2º etapa devido sua maior produção de H_2 , nos ensaios da 1º etapa, pois se sabe que a produção de (AOVs) é acompanhada pela produção de H_2 . Nos reatores pode-se encontrar a presença de acetona, metanol, etanol, n-butanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido valérico e ácido caproico.

Tabela 11 - Concentrações em mmol/L dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores (etapa2).

METABÓLI- COS	TEMPO (D)									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Acetona (mmol/L)	0,0±0,0	0,0 ± 0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0±0,0	0,0 ±0,0
Metanol (mmol/L)	0,7±0,17	0,89±0,11	1,08±0,06	1,3±0,15	1,60±0,16	1,4±0,17	1,57±0,05	1,55±0,19	1,58±0,2	1,57±0,2
Etanol (mmol/L)	51,8±9,9	47,4±0,01	39,1±11,3	46,7±6,8	52,03±7,3	41,2±4,2	44,6±10,3	57,6±2,4	45,4±6,5	42,37±1,9
n-butanol (mmol/L)	0,59±0,8	0,08±0,11	0,12±0,17	0,42±0,59	0,90±1,24	0,94±1,3	0,90±1,28	1,04±1,5	1,03±1,4	0,99±1,4
Ácido acético (mmol/L)	5,76±8,0	14,3±19,4	22,1±0,21	20,1±24,7	35,2±41,2	20,8±24,5	41,6±54,2	25,4±30,8	16,5±19, 1	16,3±13,9
Ácido propiônico (mmol/L)	0,85±0,9	1,83±1,35	2,91±1,23	1,88±0,80	1,76±0,01	0,89±0,05	0,90±0,26	1,84±1,43	1,1±0,14	6,49±8,5
Ácido isobutírico (mmol/L)	0,4±0,35	0,52±2,40	0,64±0,28	1,25±0,52	5,15±2,9	3,61±1,76	5,73±3,24	1,84±2,61	4,5±1,97	7,36±4,45
Ácido butírico (mmol/L)	9,9± 12,7	35,7±36,5	54,6±37,5	37±20,7	49,9±12,03	22,5±4,57	28,02±14	4,38±15,9	20,6±6,2	18,9±13,7
Ácido isovalérico (mmol/L)	0,17±021	0,44±0,48	0,60±0,50	0,39±0,28	0,56±0,27	0,29±0,15	0,38±0,29	29,7±0,39	0,34±0,2 5	0,33±0,01
Ácido valérico (mmol/L)	0,19±0,2	0,4 ±0,48	0,71±0,34	0,51±0,10	0,85±0,14	0,43±0,6	0,53±0,08	0,46±0,18	0,48±0,0 6	0,54±0,28
Ácido caproico (mmol/L)	0,02±0,02	0,09±0,09	0,24±0,03	0,21±0,02	0,34±0,14	0,16±0,05	0,20±0,01	0,61±0,02	0,23±0,0 4	0,32±0,04

Fonte: Autor, 2024.

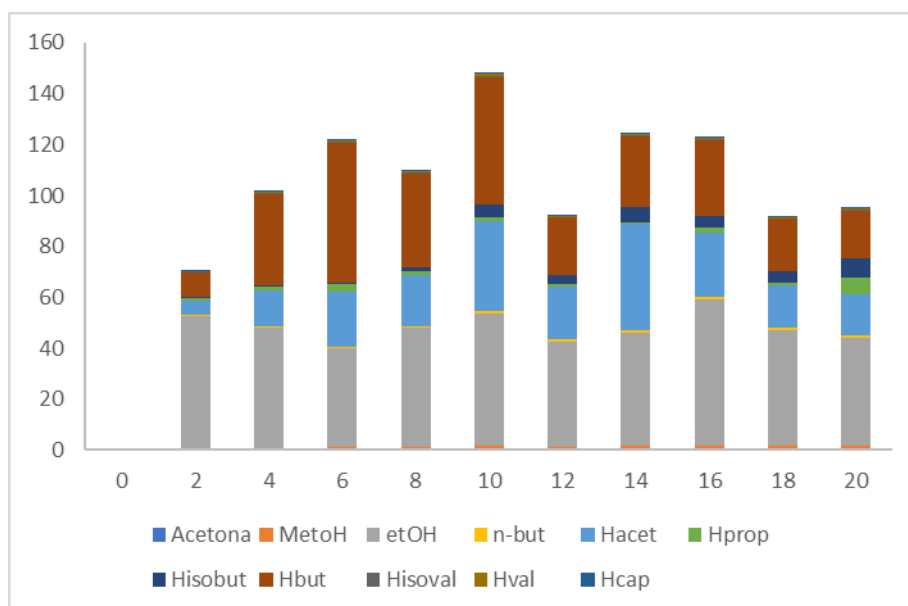
A produção de Metabólitos Solúveis Totais (MST) foi de 1078,265 mmol/L, bem como a produção de Ácidos Orgânicos Totais (TOA) foi de 589,8151 mmol/L, do inóculo liofilizado, valores superiores se comparados com os resultados observados na 1º fase do estudo, isso devido a 2º fase ter tido um volume reacional maior.

A baixa produção de ácido propiônico, pode ser observada pela relação estequiométrica (Eq. 14), já que o mesmo consome hidrogênio do meio, e que só teve um aumento mais significativo no 20º dia, quando a produção de hidrogênio se estabilizou. Por isso a baixa quantidade deste metabólico no reator é desejável para que ocorra uma maior produção de hidrogênio.



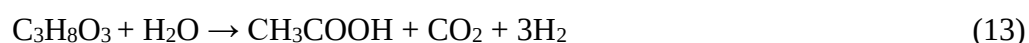
Na figura 19 é possível acompanhar a evolução de metabólitos solúveis totais (TSM) em mmol/L, 2ª etapa, que foram acompanhadas no tempo, a cada dois dias, no período total de 20 dias.

Figura 19 - Concentração de metabólitos solúveis (mmol/L).



Fonte: Autor, 2024.

A geração de bioproducto predominante foi etanol (468,22 mmol/L) seguido de ácido butírico (306,77mmol/L) e de ácido acético (217,84 mmol/L) respectivamente, indicando que o consórcio de microrganismos flutuou entre as rotas etanoica (Eq. 15), do butirato (Eq. 16) e do acetato (Eq. 17). No trabalho de Chaves et al. (2021), a partir da digestão de melaço de cana-de-açúcar, o etanol e o ácido acético foram obtidos como principais metabólitos. Já Gois et al. (2017) obtiveram o ácido butírico como metabólito majoritário produzido a partir da fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar. De acordo com Marques (2018) a grande quantidade de etanol produzido pode ser oriunda do consumo de substrato, pois os microrganismos utilizam o mesmo substrato, havendo competição por matéria orgânica.

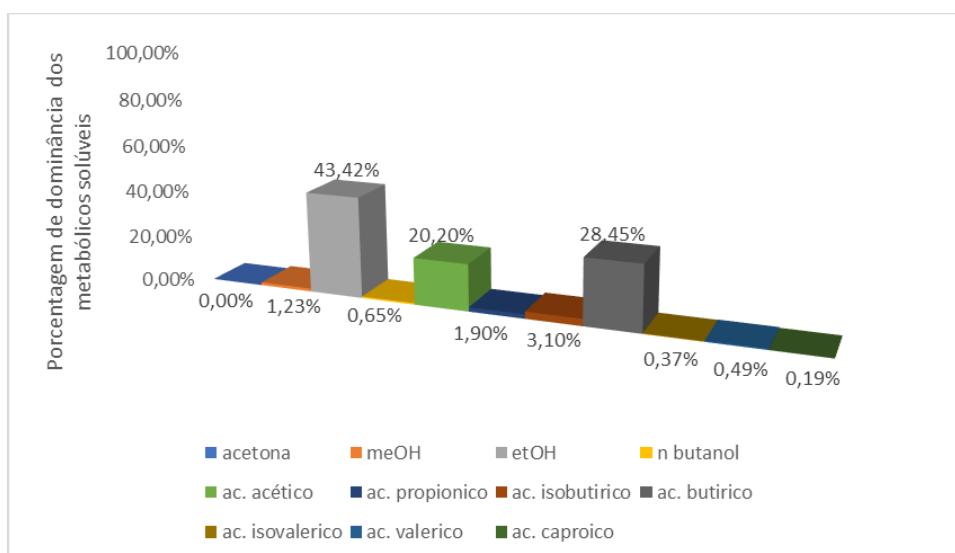


Gois (2017) em seus estudos diz que elevadas concentrações de ácido butírico estão relacionadas às maiores concentrações aplicada nos seus ensaios, assim como observado por Santos (2014), na produção de hidrogênio com vinhaça de cana-de-açúcar.

Quanto à presença do ácido acético nos reatores, pode estar relacionada com a produção de hidrogênio (eq. 12), mas também pode ser produzido através da homoacetogênese (Eq. 13), ou seja, da conversão de H_2 e CO_2 em acetato. Observa-se que esta rota, ao invés de ser indicativa da produção de hidrogênio, é consumidora do mesmo. Fato semelhante foi observado por Arooj et al. (2008), por Barros e Silva (2012) e Gois (2017), que constataram que a formação de ácido acético leva a uma redução na produção de hidrogênio.

A Figura 20 mostra as porcentagens de dominância dos metabólitos, acumulados, produzidos durante toda operação do reator.

Figura 20 - Porcentagem de dominância acumulada dos metabólitos solúveis.



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados dos metabólitos solúveis demonstram que, neste estudo, as maiores concentrações dos ácidos individualizados foram influenciadas pela variação do inóculo utilizado no ensaio e que a rota predominante para produção de hidrogênio foi a da fermentação butírica e do acetato. Percebe-se que o tratamento do inóculo foi de suma importância para produção de hidrogênio acompanhada pela produção dos ácidos orgânicos, pois foi capaz de inativar os microrganismos consumidores de hidrogênio, consequentemente isso fez com que aumentasse as concentrações dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores.

6 CONCLUSÕES

Os resultados dessa pesquisa indicam que o uso do glicerol bruto como substrato, proveniente de óleos de fritura, pode ser adotado para produção ácidos orgânicos voláteis, uma vez que a geração dos respectivos metabólicos foram detectadas, mas os contaminantes contidos no glicerol bruto podem interferir na atividade dos microrganismos com consequente diminuição na produção de H_2 .

Conclui-se que efluente de suinocultura é um potencial inóculo para produção de ácidos orgânicos e que sua otimização é de extrema importância para a seletividade dos ácidos orgânicos formados e produção de H_2 .

Os inóculo in natura e auto fermentado mesmo recebendo o tratamento térmico, para inibição de microrganismos metanogênicos, não foi bastante para eliminar os microrganismos consumidores de H_2 , uma vez que as algumas bactérias homoacetogênicas são formadoras de esporos, podendo resporular e consumir o H_2 .

Nos inóculos liofilizado e nitrogenado, possivelmente os microrganismos consumidores de H_2 foram sensíveis ao mecanismo de congelamento com N_2 líquido, produzindo efeito inibidor ou letal, restando apenas microrganismos formadores de H_2 .

Em relação à produção de H_2 , foi constatada nos reatores que o melhor resultado de produção de hidrogênio foi se utilizando o inóculo liofilizado, com uma produção acumulada de 93,068 e 155, 814 mL de H_2 (1º etapa e 2º etapa, respectivamente).

Detectou-se, em todas as fases de operação dos reatores, a presença dos ácidos acético butírico isobutírico propiônico, capróico e valérico além de n butanol, metanol e etanol. Percebeu-se que as maiores concentrações dos ácidos individualizados foram influenciadas pelo tipo de variação do inóculo empregado e que a rota predominante na produção dos ácidos orgânicos voláteis foram a butirica e do acetato.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a otimização do sistema de produção simultânea de hidrogênio e ácidos orgânicos, propõe-se para novas pesquisas:

- Investigar um tratamento prévio, além do tratamento térmico;
- Realizar uma análise microbiológica dos inóculos;
- Avaliar diferentes tipos de substratos e sua influência na produção de ácidos orgânicos e hidrogênio;
- Avaliar o impacto de diferentes condições operacionais;
- Avaliar a utilização de um biodigestor contínuo.

REFERÊNCIAS

ADORNO; M.A.T.; HIRASAWA J. S.; VARESCHE M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE), **American Journal of Analytical Chemistry**, v.4, n.7, p.406-414, 2014.

AGUILAR-AGUILAR, Fidel Alejandro. **Avaliação da produção de biometano e bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto da cadeia produtiva do biodiesel e de dejetos da suinocultura**. 2019.

AHMAD, F. **Methane production in response to sulfuric acid and hydrogen peroxide assisted hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse**. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, 2017.

AHN, E., KONCAR, M., MITTELBAACH, M., & MARR, R. A Low-Waste Process for the Production of Biodiesel. **Separation Science and Technology**, v. 30, n. 7–9, p. 2021–2033, 1995.

ANDRADE, S. **Produção de hidrogênio a partir da nopalea cochenilifera (palma forrageira) em reatores anaeróbios em batelada**. 102 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química). Universidade Federal de Alagoas, 2017.

ANGELIDAKI, Irini; SANDERS, Wendy. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science & Bio/Technology**, v. 3, p. 117-129, 2004.

ANGONESE, A. R., CAMPOS, A. T., & PALACIO, S. M. Avaliação da Eficiência de um Biodigestor Tubular na Redução da Carga Orgânica e Produção de Biogás a partir de Dejetos de Suínos. **Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural**, 2006.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association. Washington, DC, 2005.

AROOJ, M.F.; HAN, S.K.; KIM, S.H.; SHIN, H.S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 3289-3294, 2008.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.; FELIPE, M.G. (2007) Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista analítica**, n 0 26, 56-62.

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.

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.

ATRIH A.; FOSTER S. J. Bacterial endospores the ultimate survivors. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2/3, p. 217-223, 2002.

BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactor: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 59-65, 2012

BARROS, V. M.; ALMEIDA, R. F.; COSTA, M. S. Produção de ácido láctico a partir de glicerol residual utilizando *Lactobacillus plantarum*. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 15-21, 2021.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J.K.; LIMA, D.P. (2011) Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, vol. 34, no 2, 306-319.

BELLI FILHO, P.; CASTILHOS JÚNIOR, A. B.; COSTA, R. H. R.; SOARES, S. R.; PERDOMO, C. C. Tecnologias para o tratamento de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 1, p. 166-170, 2001.

BHATTACHARYA, M.; GUCHHAIT, S.; BISWAS, D.; DATTA, S. Waste lubricating oil removal in a batch reactor by mixed bacterial consortium : a kinetic study. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 11, p. 2095–2106, 2015.

BIODIESELDATA. **Exportação brasileira de glicerina e glicerol**. 2023. Disponível em: <https://www.biodieseldata.com/dado/exportacao-brasileira-de-glicerina-em-bruto-e-glicerol/>. Acesso em: 13 set. 2024.

BRASIL. Conselho Nacional de Política Energética. Resolução nº 16, de 29 de outubro de 2018. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. **Diário oficial da união**; Brasília; 2023. Disponível em: < <https://static.poder360.com.br/2023/03/Despacho-biodiesel-CNPE.pdf>> Acesso em 20 de agosto de 2023.

BUNDHOO, Z. M. A. Effects of microwave and ultrasound irradiations on dark fermentative bio-hydrogen production from food and yard wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 7, p. 4040-4050, 2017.

CAI, J.; HE, Y.; LI, X. Effect of inoculum to substrate ratio on biogas production and organic removal in a dry anaerobic co-digestion system. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 124-130, 2015.

CAMPOS C. M. M.; SALEH, B. B.; CARMO, F. R. Determination of kinetic parameters of a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) removing organic loading from swine manure effluents. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1045-1051, 2005b.

CAMPOS, A.; SILVA, A.; LIMA, J. Utilização de inóculos microbianos para aumento da eficiência de biodigestores anaeróbios. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 2, p. 345-351, 2013.

CAMPOS, C. M. M.; DAMASCENO, L. H. S.; MOCHIZUKI, E. T.; BOTELHO, C. G. Performance evaluation of a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) removing organic loading rate from swine manure. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 2, p. 390-399, 2005a.

CAVINATO, C.; FATONE, F.; BOLZONELLA, D. E PAVAN, P. (2010) - Thermophilic anaerobic co-digestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: comparison of pilot and full scale experiences. **Biores. Techn.**, vol. 101, n. 2, p. 545-550.

CHANDOLIAS, K.; PARDAEV, S.; TAHERZADEH, M. J. Biohydrogen and carboxylic acids production from wheat straw hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1093-1097, 2016.

CHANG, F.Y.; LIN, C.Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 33-39, 2004.

CHANG, S.; LI, J.; LIU, F. Continuous biohydrogen production from diluted molasses in an anaerobic contact reactor. **Front. Environ. Sci. Engin.**, v. 5, n. 1, p. 140–148, 2011.

CHAVES, T. C., GOIS, G. N. S. B., PEITER, F. S., VICH, D. V., & DE AMORIM, E. L. C. Biohydrogen production in an AFBR using sugarcane molasses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 307-316, 2021.

CHAVES, T.C **Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Maceió, p. 105. 2018.

CHEONG, D-Y.; HANSEN, C.L.; STEVENS, D.K. Production of biohydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor. **Biotechnology Bioenergy**, v. 96, p. 421-432, 2007.

CHI, Z., PYLE, D., WEN, Z., FREAR, C., & CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodieselwaste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, 2007.

COHEN, A., ZOETEMEYER, R. J., VAN DEURSEN, A., & VAN ANDEL, J. G. Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation. **Water research**, v. 13, n. 7, p. 571-580, 1979.

CREMONEZ, P. A., DE ROSSI, E., FEROLDI, M., TELEKEN, J. G., FEIDEN, A., e DIETER, J. Codigestão de água residual de suinocultura e vinhaça sob diferentes condições térmicas. **Revista de Ciências Agrárias**, 38(1), 103-110, 2015.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

DASARI, M. A., KIATSIMKUL, P. P., SUTTERLIN, W. R., & SUPPES, G. J.. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n. 1-2, p. 225-231, 2005.

DAVILA-VAZQUEZ, G., COTA-NAVARRO, C. B., ROSALES-COLUNGA, L. M., DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A., & RAZO-FLORES, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 34, p. 4296–4304, 2009.

DE BRUM, F. M. R. **Efeitos de diferentes níveis de luz, temperaturas e criopreservação na germinação e crescimento inicial de rumohra adiantiformis (forst.) ching (dryopteridaceae)**. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

DE OLIVEIRA NOBRE, Ana Carolina et al. **II-109–Avaliação do efeito da concentração inicial de glicerol residual na produção de 1, 3-propanodiol**. 2018.

DE OLIVEIRA, Rayanne Pereira; DE SOUZA, Francisco Adriano. **Criopreservação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares**. 2012.

DE SÁ, L. R. V. **Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato**. Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro–RJ (Dissertação de Mestrado), 2011.

DE SOUZA, M. E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. **Revista DAE**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984.

DE VRIEZE, J., RAPORT, L., WILLEMS, B., VERBRUGGE, S., VOLCKE, E., MEERS, E. e BOON, N. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 776-786, 2015.

DEUBLEIN, Dieter; STEINHAUSER, Angelika. **Biogas from waste and renewable resources: an introduction**. John Wiley & Sons, 2011.

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

DURRE, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.49, p639-648.

ELEFSINIOTIS, P.; WAREHAM, D. G.; SMITH, M. O. Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. **Journal of biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 289-297, 2004.

FANG, H.H.P.; LIU, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v.82, p. 87-93.

FASCETTI, E., D'ADDARIO, E., TODINI, O., & ROBERTIELLO, A. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 23, n. 9, p. 753-760, 1998.

FELIPE, M.T. C. **Efeito da preservação pelo método de liofilização sobre a estabilidade fenotípica de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae***. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FERRER, I., PONSÁ, S., VÁZQUEZ, F., & FONT, X. Increasing biogas production by thermal (70 C) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 2, p. 186- 192, 2008.

FRINK, L. A.; ARMSTRONG D. W. Using headspace gas chromatography for the measurement of water in sugar and sugar-free sweeteners and products. **Advances in food and Beverage Analysis** v.34, n.10, p.6-10, 2017.

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

GAWORSKI, M., JABŁOŃSKI, S., PAWLACZYK-GRAJA, I., ZIEWIECKI, R., RUT-KOWSKI, P., WIECZYŃSKA, A., ... & ŁUKASZEWICZ, M. Enhancing biogas plant production using pig manure and corn silage by adding wheat straw processed with liquid hot water and steam explosion. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-13, 2017.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 479-490, 1987.

GLANPRACHA, N.; ANNACHHATRE, A. P. Anaerobic co-digestion of cyanide containing cassava pulp with pig manure. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 112–121, 2016.

GOIS, G. N. S. B. **Codigestão do caldo de capim elefante BRS-Capiaçu com efluente de suinocultura visando a produção de metano.**2023.

GOIS, G. N. S. B. **Produção de hidrogênio e metano a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de leito fluidizado.** 2017.

GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol: Uma inovadora fonte de energia proveniente da produção de biodiesel. In: **2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, Key Elements for Sustainable World: Energy, Water and Climate Change, São Paulo-Brazil.** 2009.

GUO, W.; REN, N-Q.; WANG, X-J.; XIANG, W-S.; MENG, Z-H.; DING, J.; QU, Y-Y.; ZHANG, L-S. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4981–4988, 2008.

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J-P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10660-10673, 2010.

HALLENBECK, Patrick C. Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7379-7389, 2009.

HAN, W.; CHEN, H.; JIAO, A.; WANG, Z.; LI, Y.; REN, N. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 843–847, 2012a.

HAN, W.; CHEN, H.; YAO, X.; LI, Y-F.; YANG, C-P. Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by granular activated carbon in a continuous stirred-tank. **Journal of Forestry Research**, v. 21, n.4, p. 509-513, 2010.

HAN, W.; WANG, B.; ZHOU, Y.; WANG, D-X.; WANG, Y.; YUE, L-R.; LI, Y. F.fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 219-223, 2012b.

HARPER, Stephen R.; POHLAND, Frederick G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585-602, 1986.

HASSAN, M. A. The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically treated palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 485-488, 1997.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1339-1347, 2002;

HU, H.; WOOD, T. K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p. 1033–1038, 2010.

ISBIZUKA, M.M.A. (1998) Biotecnologia no tratamento de dejetos de suínos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 16-17.

IYER, P., BRUNS, M. A., ZHANG, H., VAN GINKEL, S., & LOGAN, B. E. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, p. 166-173, 2004.

JOHNSON, R. D.; WILSON, S.; THOMPSON, A. Assessment of methane emission reduction strategies from swine operations: A global review. **Environmental Science & Technology**, v. 58, n. 2, p. 856-870, 2024.

JORGE, N., SOARES, B. B. P., LUNARDI, V. M., & MALACRIDA, C. R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em 79 frituras. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 947–951, 2005.

KANADANI CAMPOS, A., DE ANDRADE MOTA, M., VICTOR DE ARAÚJO, J., & ROBERTO CECON, P. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, v. 34, p. 465-469, 2004.

KARINEN, R.S. & KRAUSE, A.O.I. (2006) New biocomponents from glycerol. **Applied Catalysis**, 306: 128-133.

KHAN, M. A.; NGO, H. H.; GUO, W.; LIU, Y.; ZHANG, X.; GUO, J.; CHANG, S. W.; NGUYEN, D. D.; WANG, J. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. **Renewable Energy**, v. 129, part B, p. 754-768, 2018.

KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 11, p. 1123–1131, 2004.

KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process. Biochem.**, v. 41, p. 199-207, 2006.

KIM, Sang Hyun et al. Biohydrogen production from glycerol by novel *Clostridium* sp. SH25 and its application to biohydrogen car operation. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 39, n. 8, p. 2156-2164, 2022.

KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1821–1830, 2014.

KRASŇAN, V., PLŽ, M., MARR, A. C., MARKOŠOVÁ, K., ROSENBERG, M., REBROŠ, M. Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. **Biochemical Engineering Journal**, 134: 114-119, 2018.

KUMAR, L. R., KAUR, R., TYAGI, R. D., & DROGUI, P. Identifying economical route for crude glycerol valorization: Biodiesel versus polyhydroxy-butyrates (PHB). **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124565, 2021.

KUNZ, A., STEINMETZ, R., HOLLAS, C., & TÁPPARO, D. Oportunidades à suinocultura pela geração e uso de biogás frente às metas de redução de metano estabelecidas na COP26. **Suinocultura Industrial** - Número 01'2022 – Ano 44 – Edição 304, 2022.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 34, p. 491-500, 2014.

LAY, J-J. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. **Biotechnology Bioenergy**, v. 74, p. 280-287, 2000.

LAY, J-J; FAN, K-S.; CHANG, I.J.; KU, C-H. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. **International Journal of Hydrogen**, v. 28, p. 1361-1367, 2003.

LEE, Y. J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 694–698, 2002.

LEITÃO, F. O., DIAS, C. P., & BRISOLA, M. V. (2020). Mensuração da capacidade de

geração de energia elétrica a partir do tratamento dos dejetos suínos. **Informe Gepec**, 24(1), 91-115.

LEITE, J.A.C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. 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.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S.V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

LETTINGA, Gatzke; REBAC, Salih; ZEEMAN, Grietje. Desafio do tratamento anaeróbico psicrófilico de águas residuais. **TRENDS in Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 363-370, 2001.

LI, C.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production in packedbed and packaging-free upflow reactors. **Water Science Technology**, v. 54, p. 95- 103, 2006.

LI, Chenlin; FANG, Herbert HP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 37, n. 1, p. 1-39, 2007.

LI, J; AI, B.; REN, N. Effect of Initial Sludge Loading Rate on the Formation of Ethanol Type Fermentation for Hydrogen Production in a Continuous Stirred-Tank Reactor. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, p. 1271-1279, 2013.

LI, Y.; ZHANG, Z.; ZHU, S.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, T.; ZHANG, Q. Comparison of bio-hydrogen production yield capacity between asynchronous and simultaneous saccharification and fermentation processes from agricultural residue by mixed anaerobic cultures. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1210-1214, 2018.

LI, Y.; ZHU, J.; WU, X.; MILLER, C.; WANG, L. The Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from Swine Wastewater Supplemented with Glucose. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, p. 1286-1296, 2010.

LIM, S.J.; CHOI, D. W.; LEE, W. G.; KWON, S.; CHANG, H. N. (2000). Volatile fatty acids production from food wastes and its application to biological nutrient removal. **Bioprocess Engineering**, v.22, p. 543-545.

LIMA, M. A.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, L. B. Conversão de glicerol em ácido acético por *Clostridium butyricum*: análise de rendimento e otimização do processo. **Journal of Cleaner Production**, v. 217, p. 183-191, 2019.

LIMA, M. A.; SANTOS, A. C.; MORAIS, F. F. Composição e tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel: desafios e oportunidades. **Journal of Cleaner Production**, v. 231, p. 189-196, 2019.

LIN, C.Y.; LEE, C.Y; TSENG, I.C.; SHIAO I. Z. (2006). Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 915– 919.

LIN, C.Y.; WU, C.C.; HUNG, C.H. Temperature effects on fermentative hydrogen from xylose using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 43-50, 2008a.

LIN, Y.C. (2013) Catalytic valorization of glycerol to hydrogen and syngas. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 2678-2700.

LIU, Wen-Tso; CHAN, On-Chim; FANG, Herbert HP. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. **Water research**, v. 36, n. 13, p. 3203-3210, 2002.

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.

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

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–9, 2008.

MARQUES, A. C. Appelt. **Produção biológica de H₂ e CH₄ a partir do glicerol bruto sob condições termofílicas**. 2021.

MARQUES, T.D. **Produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fluidificado a partir do soro de leite**. 2018.

MIZUNO, O.; DINSDALE, R.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; NOIKE, T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 59-65, 2000.

MOON, C.; HWAN LEE, C.; SANG, B. I.; UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10561–10568, 2011.

MOSEY, F.E. (1983). Mathematical modeling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile fatty acids from glucose. **Water Science Technology**, v.15, p209-232, Copenhagen.

MOTA, Claudio JA; DA SILVA, Carolina XA; GONÇALVES, Valter LC. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, p. 639-648, 2009.

MU, Y.; ZHENG, X.J.; YU, H.Q.; ZHU, R.F. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 780-785, 2006.

NEVES, L.M.V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. Dissertação de Engenharia Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2009.

NGO, Tien Anh; KIM, Mi-Sun; SIM, Sang Jun. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 10, p. 5836-5842, 2011.

NGUYEN, H. T.; LEE, J. H.; ZHENG, X. Recent advances in swine manure management: Technology and policy developments. **Journal of Cleaner Production**, v. 416, p. 130-145, 2024.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 21-316, 2010.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. **Meat consumption in Brazil**. Disponível in: <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>. Acesso em: 19 de setembro de 2023.

OH, S.-E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environmental science e technology**, v. 37, n. 22, p. 5186–90, 15 nov. 2003.

OJEDIRAN, O. J., DAHUNSI, S. O., ADERIBIGBE, V., ABOLUSORO, S., ADESULU-DAHUNSI, A. T., ODEKANLE, E. L., ... & OGUNWOLE, J. O. Valorization of *Pennisetum purpureum* (Elephant grass) and piggery manure for energy generation. **Fuel**, 302, 121209, 2021.

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, T. F. **Métodos de preservação de efluentes: teorias e práticas laboratoriais**. Rio de Janeiro: TecBio, 2018.

OLIVEIRA, P. A.; MORAIS, L. F.; MARTINS, J. D. Advances in waste management in the Brazilian pork industry: An overview. **Journal of Cleaner Production**, v. 389, p. 135-146, 2024.

OLIVER, A. D. P. M., Neto, A. A. Manual de treinamento em biodigestão. **Instituto de Estudos Del Hambre. Bahia**, v. 23, p. 93, 2008.

O-THONG, S.; PRASERTAN, P.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1204-1214, 2008.

OTTAVIANO, L. M. *et al.* Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy, Oxford**, v. 42, n.8, p. 4848-4860, 2017.

PAES, J. L., MATOS, C. F., FERNANDES, P. L. B. G., BRUGGIANESI, G., & DE QUEIROZ, C. K. Estudo da biodigestão anaeróbica de dejetos de suíno submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. In: **XLVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**. 2017.

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 anaeróbio de leito fluidificado**, 2016.

PEIXOTO, G. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes**. Dissertação (mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

PENTEADO, E. D. **Influência da origem e do pré-tratamento do inoculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreator**. 2012. 143 f. Dissertação (Mestrado em engenharia hidráulica e saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PEREIRA, M. A.; REIS, C. E.; OLIVEIRA, V. F. Produção simultânea de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir de glicerol por consórcios microbianos mistos. **Renewable Energy**, v. 133, p. 945-952, 2019.

PEREYRA, D. D. L. A. D. **Cofermentação de glicerol e melaço como alternativas para produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado**. 2019.

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

PLÁ, Juan Algorta. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 30, n. 2, p. 179-190, 2002.

QUISPE, C. A., CORONADO, C. J., & CARVALHO JR, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 27, p. 475-493, 2013.

RIVALDI, J. D., SARROUH, B. F., SILVA, S. S. D., & FIORILO, R. Biotechnological strategies for glycerol utilization derived from bio diesel production; Glicerol de biodiesel: estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Bi-otecnologia Ciencia and Desenvolvimento**, 2007.

RODRIGUES, C. V., NESPECA, M. G., SAKAMOTO, I. K., DE OLIVEIRA, J. E., VARESCHE, M. B. A., & MAINTINGUER, S. I. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.144-154, jan. 2019. Elsevier BV.

ROSSI, D. M.; ZAIAT, M.; KUNZ, A.; FORESTI, E. Dark fermentation: Production of biohydrogen from organic residuals. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8493-8501, 2011.

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

SABARATNAM, V.; HASSAN, Mohammad Ali. Biohydrogen production via fermentation of biowastes by microorganisms. State of the art and progress in production of biohydrogen. **Danvers: Bentham Science Publishers**, p. 112-26, 2012.

SANTANA, A. M.; OLIVEIRA, R. A. **Desempenho de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo em dois estágios tratando águas residuárias de suinocultura**. Engenharia Agrícola, v. 25, n. 3, p. 817-830, 2005.

SANTORI, G.; NICOLA, G. D.; MOGLIE, M.; POLONARA, F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**, v. 92, p. 109-132, Apr. 2012.

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, K. G. D., ROSSI, E. D., KUGELMEIER, C. L., CREMONEZ, P. A., & TIETZ, C. M. Glicerina: Utilidades e destinações. **Acta Iguazu, Cascavel**, v.2, n.4, p. 109-119, 2013.

SANTOS, P. H.; CARVALHO, R. C.; MENDES, A. S. **Biotecnologia aplicada ao tratamento de resíduos líquidos: princípios e técnicas criogênicas**. Curitiba: Ed. Universitária, 2020.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473-6490, Apr. 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMAS, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo, Blucher, v. 2, p.93-114, 2001.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098-1106, Dec. 2009.

SHI, W., HUO, L., WANG, H., ZHANG, H., YANG, J., & WEI, P. Hydrothermal growth and gas sensing property of flower-shaped SnS₂ nanostructures. **Nanotechnology**, v. 17, n. 12, p. 2918, 2006.

SHIDA, Gessia Momoe. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SIDDIQUE, Md. Nurul Islam; WAHID, Zularisam Ab. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 194, p. 359–371, 2018. a. DOI: 10.1016/J.JCLEPRO.2018.05.155.

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.

SILVA, C. E. D. F.; ABUD, A. K. D. S. Anaerobic biodigestion of sugarcane vinasse under mesophilic conditions using manure as inoculum. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, p. 763-777, 2016.

SILVA, Flaviane Cristina. **Avaliação da condição nutricional e do tipo de inóculo na geração de bioprodutos a partir da fermentação de glicerol residual**. 2017.

SILVA, J. R.; SOARES, M. C.; FERRARI, A. M. Environmental impacts of intensive pig farming: Recent developments and mitigation strategies. **Environmental Management**, v. 71, n. 2, p. 181-193, 2023.

SILVA, M. D. L. C. D., MARTINEZ, P. F., IZELI, N. L., SILVA, I. R., VASCONCELOS, A. F. D., CARDOSO, M. D. S., ... & BARBOSA, A. D. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 85-92, agosto 2006.

SILVA, T. A. R. D. **Biodiesel de óleo residual: produção através da transesterificação por metanólise e etanólise básica, caracterização físico-química e otimização das condições reacionais.** 2011.

SILVA, T. M.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Produção de hidrogênio a partir de glicerol por fermentação anaeróbica utilizando diferentes consórcios microbianos. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 777-785, 2020.

SILVA, W.R. **Estudo cinético do processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos vegetais.** 2009.

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**, [S.L.], v. 42, n. 45, p. 27558-27569, nov. 2017. Elsevier BV.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; PARK, J. H.; PARK, J. H.; PARK, H. D.; YOON, J. J.; KIM, S. H. Feasibility of enriched mixed cultures obtained by repeated batch transfer in continuous hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4393-4403, Feb. 2016.

SONG M, SHIN SG, HWANG S. Methanogenic population dynamics assessed by realtime quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. **Bioresour Technol**; 101, S23–8, 2010.

SOUZA, A. P.; SANTOS, C. A.; LIMA, P. R. Fermentação de glicerol para produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*: uma abordagem biotecnológica. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 176-183, 2018.

TAKABATAKE, H.; SUZUKI, K.; KO, I.B.; NOIKE, T. (2004). Characteristics of anaerobic ammonia removal by a mixed culture of hydrogen producing photosynthetic bacteria. **Bioresource Technology**, v.95, p.151–158

TEMUDO, M. F.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: Impact of the pH and 124 carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 1121–1130, 2008.

TERRACINO, J.S, KASHKET, E.R (1986). Intracellular conditions required for initiation of solvent productionby *Clostridium acetobutlicum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.52, p.86-91.

UM, Y.; YU, H. Q.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. **Chemosphere**, v. 64, n. 3, p. 350–358, 2006.

UMPIERRE, A.; MACHADO, F. Gliceriquímica e valorização do glicerol. **Revista virtual de química**, v. 5, n. 1, p. 106-116, 2013.

VALDEZ-VAZQUEZ, I., TORRES-AGUIRRE, G. J., MOLINA, C., & RUIZ-AGUILAR, G. M. Characterization of a lignocellulolytic consortium and methane production from untreated wheat straw: dependence on nitrogen and phosphorous content. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 4237-4251, 2016.

VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J.J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 4726- 4730.

VAZOLLER, R. F. **Ecologia da digestão anaeróbia – Ênfase às bactérias metanogênicas**. Trabalho apresentado no seminário: Tratamento anaeróbio de resíduos. EESC-USP, julho,1990.

VIANA, Michael Barbosa. **Digestão anaeróbia do glicerol oriundo da produção do biodiesel: alternativas para geração de energia e produtos de alto valor agregado**. 2016.

VIVEK, N., ASWATHI, T. V., SVEN, P. R., PANDEY, A., & BINOD, P. Self-cycling fermentation for 1,3-propanediol production: Comparative evaluation of metabolite flux in cell recycling, simple batch and continuous processes using *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3 strain. **Journal of Biotechnology**, v. 259, p. 110–119, 2017.

WANG JL, WAN W. Comparação de diferentes métodos de prétratamento para enriquecer culturas produtoras de hidrogênio a partir de lodo digerido. **Int J Hydrogen Energy** 2008;33: 2934–41.

WANG XJ, YANG GH, FENG YZ, REN GX, HAN XH. Optimizing feeding composition and carbon—nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic codigestion of dairy, chicken manure and wheat straw. **Bioresour Technol** 2012;120: 78–83.

WANG, G.; MU, Y.; YU, H.Q. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 175-184, 2005.

WANG, Jianlong; WAN, Wei. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International journal of hydrogen energy**, v. 34, n. 2, p. 799-811, 2009.

WANG, Y. Y.; AI, P; HU, C.; ZHANG, Y. Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 390–396, 2011.

WANG, Z.; YANG, S.T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 116 – 123, 2013.

WONG YM, WU TY, JUAN JC. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 34, 471-482, 2014.

XAVIER, C. D. A., & LUCAS JÚNIOR, J. D. Parâmetros de dimensionamento para biodigestores batelada operados com dejetos de vacas leiteiras com e sem uso de inóculo. **Engenharia Agrícola**, v. 30, p. 212-223, 2010.

XING, D.F.; REN, N.Q.; WANG, A.J.; LI, Q.B.; FENG, Y.J.; MA, F. Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbiense* YUAN-3 under non-sterile condition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1489-1495, 2008.

YANG, L., XU, F., GE, X., & LI, Y. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 824-834, 2015.

YIN D, LIU W, ZHAI N, FENG Y, YANG G, WANG X, HAN X. Production of bio-energy from pig manure: a focus on the dynamics change of four parameters under sunlight-dark conditions. **Plos One**.2015;10(5).

YU, H. Q., ZHENG, X. J., HU, Z. H., & GU, G. W. High-rate anaerobic hydrolysis and acidogenesis of sewage sludge in a modified upflow reactor. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 69-75, 2003.

YU, H.Q and Fang, H.P. (2001). Acidification of mid and high-strength dairy wastewaters. **Water science and Technology**, v.35, n.15, p.3697-3705.

YU, J. (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v.86, p.105–112.

YU, J.; SI, Y.; WONG, W.K.R. (2002). Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia Eutropha*. **Process Biochemistry**, v.37, p.731–738.

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

ZHANG, Z. P., SHOW, K. Y., TAY, J. H., LIANG, D. T., LEE, D. J., & JIANG, W. J. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2118-2123, 2006.

ZHANG, Z. P., SHOW, K. Y., TAY, J. H., LIANG, D. T., LEE, D. J., & JIANG, W. J.

ZHANG, Z.; ZHANG, G.; LI, W.; LI, C.; XU, G. Enhanced biogas production from sorghum stem by co-digestion with cow manure. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 21, p. 9153-9158, 2016.

ZHU, G.; LIU, C.; LI, J.; REN, N.; LIU, L.; HUANG, X. Fermentative hydrogen production from beet sugar factory wastewater treatment in a continuous stirred tank reactor using anaerobic mixed consortia. **Front. Environ. Sci. Eng.** v. 7, n. 1, p. 143-150, 2013.

ZUMAR BUNDHOO MA, MOHEE R, ALI HASSAN M. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: **A review. Journal of Environmental Management** 157, 20-48, 2015.

ZWIETERING, M.H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.